



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



**MILENA SANTANA CABRAL**

**ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTIMÚSCULO  
LISO EM PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA  
PELO VÍRUS C**

Salvador  
2011

**MILENA SANTANA CABRAL**

**ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTIMÚSCULO  
LISO EM PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA  
PELO VÍRUS C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Co-orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta

Salvador  
2011

## Sistema de Bibliotecas – UFBA

Cabral, Milena Santana.  
Especificidade de anticorpos antimúsculo liso em portadores de hepatite crônica pelo vírus C /  
Milena Santana Cabral. - 2011.  
61 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Luiza Brito de Sousa Atta.

Co-orientador: Prof. Dr. Ájax Mercês Atta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,  
2011.

1. Hepatite crônica ativa. 2. Hepatite C. 3. Anticorpos. 4. Imunofluorescência. I. Atta, Maria

Luiza Brito de Sousa. II. Atta, Ájax Mercês. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de  
Farmácia. IV. Título.

CDD - 616.3623  
CDU - 616.36-002



Universidade Federal da Bahia  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PPGFAR  
www.ppgfar.far.ufba.br  
Rua Barão de Jeremoabo s/nº, Ondina, CEP 40170115 Salvador-BA  
ppgfar@ufba.br/ Tel : (71) 3283-6920

## TERMO DE APROVAÇÃO

MILENA SANTANA CABRAL

### ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO EM PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 16 de junho de 2011.

#### BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

Dra. Helma Pinchemel Cotrim  
Universidade Federal da Bahia

Dr. Moyses Sadigursky  
Universidade Federal da Bahia

Apoio Financeiro:

FAPESB/MS

CNPq

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ (Protocolo nº 162)

A  
minha mãe, meu pai e meu noivo  
Por toda compreensão, carinho e pelo eterno apoio e auxílio incondicional.  
Este trabalho eu dedico a vocês, os grandes amores da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pai todo poderoso, por simplesmente me amar e estar presente em minha vida.

A minha mãe, Angélica, por toda dedicação e por abdicar da sua própria vida em favor da minha. Por fazer acontecer todos os meus anseios e por sempre me ouvir nos momentos de alegria e de inquietude. Mais ainda, por me amar de forma sobrenatural.

A meu pai, que por mais distante que possa estar fisicamente, não podendo estar tão presente no meu dia-a-dia, sempre me admirou como filha e sempre se emocionou só de ouvir falar o meu nome.

A Daniel, meu noivo, por me fazer tão feliz e por me fazer ser uma nova mulher. Estar ao seu lado durante todos esses anos foi um presente de Deus. Obrigada meu amor.

À minha tia Luiza por estar sempre orando e torcendo pelo meu sucesso.

Às amigas mais queridas, desde a escola até os tempos da faculdade. Em especial, às minhas parceiras Mari e Paulinha por estarem sempre ao meu lado.

À professora Maria Luiza, por ser uma orientadora MÃE, que me ajudou a escolher o caminho trilhado: ser mestra e uma profissional dedicada e responsável. Obrigada pela atenção, paciência e pelos ensinamentos valiosos!

Ao professor Ajax, que é muito mais do que um co-orientador, é o verdadeiro pai da imunologia. Aprendi muito com seus ensinamentos.

À família DILDA/LAPIM, que ajudei a construir ao longo desses 5 anos e que fez valer a pena todos os momentos. Liu, Bela e Iza, em especial, moram no meu coração.

A Faculdade de Farmácia por ser o meu segundo lar e por ter me proporcionado grandes momentos de aprendizado.

Aos grandes professores do curso de Pós-Graduação em Farmácia por terem se dedicado a este curso inovador com tanta garra.

Aos amigos da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial Antídio, pelo carinho e por me fazer aproximar mais de Deus.

Ao Dr. Raymundo Paraná e equipe pela colaboração para realização deste trabalho e aos pacientes do Ambulatório Magalhães Neto que, voluntariamente, participaram desse estudo.

À ORGENTEC pela concessão do programa iVISION.

À FAPESB pelo auxílio financeiro a mim concedido.

À todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho.

## RESUMO

CABRAL, Milena Santana. **Especificidade de anticorpos antimúsculo liso em portadores de hepatite crônica pelo vírus C.** 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

A infecção crônica pelo VHC tem como principal característica a associação com diversas manifestações autoimunes. Dentre estas, a aumentada expressão de autoanticorpos não-órgão específicos, como os anticorpos antimúsculo liso, com possível importância na patogênese da doença. **Objetivos:** (1) Determinar a prevalência de anticorpos antimúsculo liso e sua distribuição conforme o gênero em portadores de HCC; (2) caracterizar a reatividade sorológica dos anticorpos antimúsculo liso usando como referência os padrões de fluorescência previamente determinados; (3) estabelecer as associações entre a reatividade sorológica dos anticorpos antimúsculo liso com os dados clínicos e laboratoriais dos portadores de hepatite C; (4) caracterizar imunologicamente os anticorpos frente a antígenos purificados. **Pacientes:** Foram avaliados 100 portadores de HCC, sem tratamento antiviral prévio, com diagnóstico clínico, sorológico, virológico, e histopatológico, acompanhados no C-HUPES. **Métodos:** Anticorpos antimúsculo liso e antinúcleo foram pesquisados por imunofluorescência indireta e a especificidade imunológica investigada através de imunoblot. Dosagens de fator reumatóide, haptoglobina e IgG foram realizadas por nefelometria. Crioglobulinas foram determinadas por crioprecipitação em tubo e por gel-difusão e a ALT por método cinético. Os dados de genótipo e histopatológico foram obtidos dos prontuários. **Resultados:** Anticorpos antimúsculo liso foram detectados em 21% dos pacientes (55 homens, 45 mulheres), sendo o padrão de fluorescência AML-v o mais frequentemente observado (81%). A associação de padrões mais prevalente foi AML-v e AML-m (71%). A maioria dos títulos dos autoanticorpos foi baixa, com apenas quatro amostras apresentando títulos superiores a 1/40. Apenas uma amostra apresentou padrão glomerular com título maior que 1/40, e não foi encontrado padrão tubular. Das três proteínas associadas aos AML, os portadores de HCC com AML positivos apresentaram maior frequência de reatividade para a actina-F, ocorrendo em 29% das amostras. A associação entre os AML e este antígeno alvo foi significativa ( $P=0,005$ ). Não houve associação estatisticamente significativa entre os antígenos desmina e miosina, com os AML, e a prevalência de reatividade para esses antígenos foi inferior. Com o uso do imunoblot comercial, foi encontrada a presença do autoanticorpo anti-LC1 em 52% das amostras positivas para AML e em 15% das amostras negativas para esse mesmo anticorpo. Foi encontrada também a presença do anti-SLA/LP em 14% das amostras positivas para AML e em 8% das amostras que não apresentavam este autoanticorpo. Os anticorpos AMA-M2 e anti-LKM1 não foram encontrados em nenhum dos grupos avaliados. **Conclusões:** Uma prevalência de 21% para AML foi encontrada neste estudo, com uma relação homem/mulher de 1,1/1. A presença de AML não foi associada a qualquer dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais deste grupo de portadores de HCC, nem associada à lesão tecidual. Determinar os padrões de fluorescência e título das amostras é relevante na detecção dos AML. Apenas a minoria dos AML de portadores de HCC reconhecem as proteínas actina-F, desmina e miosina. Foi documentado elevada expressão de anticorpos anti-LC1 neste grupo de portadores de HCC.

**Palavras-Chave:** anticorpos em HCC, imunofluorescência para AML, anticorpos anti-actina.

## ABSTRACT

CABRAL, Milena Santana. **Smooth muscle antibodies specificities in chronic hepatitis C virus carriers**. 61f. Master Dissertation – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

The main characteristic in HCV chronic infection is the association with various autoimmune manifestations. Among them, the increased expression of non-organ specific autoantibodies, such smooth muscle antibody, which possible role in HCV pathogenesis. **Objectives:** (1) Determine the prevalence of smooth muscle antibodies and their distribution according gender in patients with chronic hepatitis C; (2) characterize the serological reactivity of these autoantibodies in accordance with predetermined patterns of fluorescence; (3) establish associations between serologic reactivity of them with clinical and laboratory data from these patients; (4) characterize the antibodies immunochemically with purified antigens. **Patients:** 100 HCV carriers before treatment had been evaluated, with previous clinical, serological, virological and histopathological diagnosis, from C-HUPES. **Methods:** Smooth muscle and antinuclear antibodies were performed by indirect immunofluorescence and immunochemical reactivity was determined by immunoblot. Rheumatoid factor, haptoglobin and IgG were quantified by nephelometry. Cryoglobulins were determined by cryoprecipitation in tube and gel-diffusion and the determination of ALT by UV kinetics. Genotype and histopathological data were obtained from medical records. **Results:** 21% of HCV carriers presented anti-smooth muscle antibodies (55 men, 45 women); with the AML-v pattern the most found (81%). Also, the AML-v and AML-m patterns were the association more prevalent (71%). The titles of most autoantibodies were low, but four samples showed titles above 1/40. Only one sample showed glomeruli pattern with titles greater than 1/40, and no tubular pattern was found. In the imunoblot, the HCV carriers AML positive presented a major reactivity for F-actin (29%), which association with these autoantibody was significant ( $P=0.005$ ). There was no association between AML with desmin and myosin, which reactivities of the AML to these proteins were low. Autoantibodies anti-LC1 was found in 52% of samples AML positive and in 15% of samples AML negative. It was also found the presence of anti-SLA/LP in 14% of positive samples for AML and in 8% of the negative samples. AMA-M2 antibodies and anti-LKM1 were not found in any of these groups. **Conclusions:** This study found an AML prevalence of 21%, with 1.1/1 men/women relation. The AML presence was not associated with any of the demographic, clinical and laboratory data from the HCV carries evaluated or associated with tissue lesion. Determine fluorescence patterns and sample titles are relevant to detect these antibodies. Only the minority of the AML from HCV carriers evaluated recognized the proteins F-actin, desmin and myosin. High expression of anti-LC1 antibodies were found in these HCV carries.

**Keywords:** HCV antibodies, anti-smooth muscle, fluorescence pattern, F-actina.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Enzima Alanina aminotransferase
AMA M2	Anticorpo antimitocôndria do tipo M2
AML	Anticorpos antimúsculo liso
AML-f	Anticorpos antimúsculo liso - padrão fibras interglandulares
AML-g	Anticorpos antimúsculo liso - padrão glomerular
AML-m	Anticorpos antimúsculo liso - padrão muscular da mucosa
AML-t	Anticorpos antimúsculo liso - padrão tubular
AML-v	Anticorpos antimúsculo liso - padrão de vaso
ANA	Anticorpos antinúcleo
ANTI-LC1	Anticorpos anti-citosol hepático do tipo 1
ANTI-LKM	Anticorpos anti-microsossoma de fígado e rim
ANTI-SLA/LP	Anticorpos anti-antígeno solúvel de fígado/fígado e pâncreas
ANTI-VHC	Anticorpos anti-vírus da hepatite C
BCIP/NBT	Fosfato de 5-bromo-4-cloro-indolil/ Nitroblue tetrazólio
CBP	Cirrose biliar primária
CD81	<i>Cluster of differentiation</i> ou grupo de diferenciação 81
C-HUPES	Complexo Hospitalar - Hospital Universitário Professor Edgar Santos
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO	Controle do <i>cut-off</i>
CRIOG	Crioglobulinas

CYP	Citocromo P
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Controle do conjugado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Assay</i> ou Enzimaimunoensaio
E2	Glicoproteína do envelope viral tipo 2 do vírus da hepatite C
FR	Fator reumatóide
HAI	Hepatite autoimune
HAI-1	Hepatite autoimune tipo 1
HAI-2	Hepatite autoimune tipo 2
HAP	Haptoglobina
HCC	Hepatite C crônica
HEP-2	Célula hepitelial humana – linhagem 2
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HTLV	Vírus linfotrópico de célula T humana
IC	Intervalo de confiança
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IQR	Intervalo interquartil
LES	Lupus eritematoso sistêmico
NOSA	Autoanticorpos não-órgão específicos

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ou solução tampão salina fosfatada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
SC	Controle da amostra
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UV	Ultravioleta
VHC	Vírus da hepatite C

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Níveis séricos de ALT em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. Valores de referência: 41 U/L para Homens e 31 U/L para Mulheres. As barras representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. .... 37
- Figura 2** - Níveis séricos de Haptoglobina em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. As linhas verdes representam os valores de referência mínimo e máximo. As barras pretas representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. .... 37
- Figura 3** - Níveis séricos de Imunoglobulina G (IgG) em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. As linhas verdes representam os valores de referência mínimo e máximo (600 – 1.500 mg/dL). As barras pretas representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. .... 38
- Figura 4** - Marcadores laboratoriais de autoimunidade em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. .... 38
- Figura 5** - Imunoblot (Liver-7-Line, Orgentec, Diagnostika GmbH) de indivíduos sadios (1 - 4) e portadores das seguintes patologias: cirrose biliar primária (5), hepatite autoimune (6 - 8), HCV AML-negativos (9 - 12), HCV AML+ 1/80 (13) HCV AML+ 1/160 (14) e HCV AML+ 1/320 (15). .... 41
- Figura 6** - Reatividade de 12 amostras de soros de indivíduos sadios doadores de banco de sangue frente a antígenos do fígado altamente purificados através da metodologia de imunoblot (*Liver-7-Line*, Orgentec, Diagnostika GmbH). .... 42
- Figura 7** - Especificidade determinada por imunoblot (*Liver-7-Line*, Orgentec, Diagnostika GmbH) de autoanticorpos para antígenos purificados do fígado em 21 amostras de soro de portadores do HCC com presença de AML com título igual ou superior a 1/40, avaliados por imunofluorescência em cortes de tecido de estômago/rim/fígado de rato. .... 43
- Figura 8** - Especificidade determinada por imunoblot (*Liver-7-Line*, Orgentec, Diagnostika GmbH) de autoanticorpos para antígenos purificados do fígado em 26 amostras de soro de portadores de HCC com ausência de AML, avaliados por imunofluorescência em cortes de tecido de estômago/rim/fígado de rato. .... 44
- Figura 9** - Associação entre a presença de AML e anticorpos anti-actina F detectados por imunoblot (teste exato de Fisher). .... 44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Características demográficas e da infecção dos 100 indivíduos portadores de hepatite C crônica.....	36
<b>Tabela 2</b> – Caracterização dos padrões de fluorescência dos AML na triagem a 1/20. ....	39
<b>Tabela 3</b> – Caracterização dos padrões de fluorescência dos AML na diluição de 1/40. ....	40
<b>Tabela 4</b> – Associação dos padrões de fluorescência dos AML. ....	40

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 O VÍRUS E SUA TRANSMISSÃO.....	17
1.2 A INFECÇÃO E SUAS CARACTERÍSTICAS .....	19
1.3 MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS: PRODUÇÃO DE AUTOANTICORPOS.....	20
1.4 ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO .....	21
<b>2 RELEVÂNCIA</b> .....	<b>27</b>
2.1 HIPÓTESE: .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 PACIENTES .....	29
4.2 MÉTODOS .....	29
4.2.1 Obtenção das amostras.....	29
4.2.2 Obtenção dos dados de genótipo e histopatologia .....	30
4.2.3 Determinação da atividade da enzima Alanina Aminotransferase (ALT).....	30
4.2.4 Pesquisa de Crioglobulinas (CRIOG) .....	30
4.2.5 Pesquisa de Fator Reumatóide (FR).....	31
4.2.6 Dosagem de Haptoglobina (HAP) .....	31
4.2.7 Dosagem de Imunoglobulina G total sérica (IgG) .....	32
4.2.8 Determinação de Anticorpos Antinúcleo (ANA) .....	32
4.2.9 Determinação e Caracterização de anticorpos antimúsculo liso (AML) .....	32
4.2.10 Caracterização imunoquímica dos anticorpos antimúsculo liso.....	33
4.2.11 Análises estatísticas .....	34
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO .....	35
5.2 PESQUISA DE AUTOANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO .....	39
5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL IMUNOQUÍMICO DOS ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO .....	41
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>

<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....	60
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO. ....	61

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é, atualmente, um grande problema de saúde no mundo, sendo uma das principais causas de doença do fígado e indicações de transplantes, mesmo com todo o advento das eficientes terapias que hoje se encontram disponíveis (GUIDO et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 3% da população mundial, o que equivale a mais de 170 milhões de pessoas, estão infectadas cronicamente por este vírus, sendo que esta forma da doença propicia um maior risco de morte, em relação à sua forma aguda (THOMSON; FINCH, 2005; GATSELIS et al., 2006; ZEREMSKI et al., 2007; OMLAND et al., 2010).

A hepatite C crônica (HCC) é endêmica na maior parte do mundo, entretanto, existem consideráveis variações temporais e geográficas na incidência e prevalência da infecção (THOMSON; FINCH, 2005). De acordo com a OMS, em lugares como a África e sudeste da Ásia, a prevalência de hepatite C é maior que 2%, com o Egito apresentando uma prevalência maior que 25% (RAMOS-CASALS et al., 2005; THOMSON; FINCH, 2005; LEPE et al., 2006).

Nos Estados Unidos da América (EUA) e na maior parte da Europa, essa prevalência é menor que 2%, havendo, no entanto, mais de três milhões de americanos cronicamente infectados. Na Austrália, Canadá e nordeste da Europa, essa prevalência é menor que 1%, demonstrando que a maior parte dos casos de infecção por esse vírus ocorre em populações de países menos desenvolvidos, sendo que, aqueles que estão infectados nas localidades de baixa prevalência, provavelmente são imigrantes e não nascidos nessas regiões (CRAXI et al., 2008; MANN et al., 2008).

O estudo realizado por Mann et al. (2008), demonstrou que é a minoria étnica nas regiões de baixa prevalência que apresenta uma maior taxa de infecção e que esses indivíduos têm maior risco de consequências graves, em relação aos indivíduos nascidos em países desenvolvidos. Um estudo anterior realizado por Lepe et al. (2006), demonstrou também que a duração estimada da infecção e a história de uso de álcool foram similares entre diversos grupos étnicos, sugerindo que fatores relacionados à raça podem influenciar a história natural da hepatite C. Sabendo-se

dessa diversidade, torna-se cada vez mais evidente que algumas características da infecção pelo vírus C variam de acordo com a raça/etnicidade do indivíduo e, devido a isso, as diferenças entre brancos, africanos e hispânicos têm recebido bastante atenção por parte dos centros de estudos. Além da raça, a prevalência da hepatite C tem sido relacionada à idade, sendo que crianças e adolescentes têm exibido taxas muito baixas da infecção (0,4%) (GUIDO et al., 2011).

Dentre os indivíduos que são expostos ao vírus, a maioria (50-80%) desenvolve infecção crônica, resultando em hepatite crônica que pode levar a cirrose e/ou carcinoma hepatocelular, enquanto que a fase aguda é frequentemente subclínica. Entretanto, a gravidade da inflamação crônica e a taxa de progressão da doença do fígado variam, consideravelmente, onde 20-33% dos portadores crônicos progridem para cirrose depois de 20 a 30 anos e, recentes estudos mostram que há uma maior taxa de mortalidade entre portadores da infecção do vírus C, em relação à população em geral (ZEREMSKI et al., 2007; FARQUHAR; MCKEATING, 2008; OMLAND et al., 2010).

Desde 1990, a incidência de casos novos de hepatite C reduziu drasticamente devido ao efetivo controle sorológico realizado nos bancos de sangue. No entanto, embora tenha ocorrido essa redução, a lenta progressão da doença faz prever que nos próximos anos, haverá ainda um significativo aumento no diagnóstico de pacientes com a infecção crônica pelo vírus C (HOOFNAGLE, 1997; LAUER; WALKER, 2001).

### 1.1. O VÍRUS E SUA TRANSMISSÃO

O vírus da hepatite C é um vírus linear, com RNA de fita simples do gênero *Hepacivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, sendo identificado em 1989, e considerado o principal agente causador das hepatites denominadas até então de não-A/não-B (RAMOS-CASALS et al., 2005; DUSTIN; RICE, 2007). O VHC, por ser um vírus RNA, não necessita integrar-se ao DNA do hospedeiro para replicação, além de ser altamente mutante, o que resulta em formidável evasão da resposta

imune e em baixa memória para produção de anticorpos, em casos de reinfecção (STAUB, 1998; BRANDÃO et al., 2001).

Devido à sua instabilidade genética, durante a replicação viral, o VHC constitui-se em uma família heterogênea do vírus, possuindo onze genótipos, com seis sendo os principais, de patogenicidade semelhante, e dezenas de subtipos que diferem não só na distribuição geográfica, mas também, na resposta à terapia antiviral (DUSTIN; RICE, 2007; VISWANATHA; DOGAN, 2007; GUIDO et al., 2011). Essa variabilidade genética do vírus implica na sua habilidade de sobreviver à ação do sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo as altas taxas de cronicidade dessa infecção, além da possibilidade de reinfecção por subtipos diferentes em um mesmo indivíduo (HOOFNAGLE, 1997; LAUER; WALKER, 2001).

No Brasil, em relação a esta heterogeneidade, prevalecem em ordem decrescente de importância os genótipos 1, 3 e 2, sendo o genótipo 1 mais resistente ao tratamento, principalmente em afrodescendentes, em detrimento de indivíduos caucasianos (FOCACCIA et al., 2004; THOMSON; FINCH, 2005; LEPE et al., 2006). O VHC, no entanto não é um vírus completamente citopático e, devido a isso, as reações imunes têm um papel central no desenvolvimento da hepatite crônica. A falta de uma resposta efetiva das células TH1 e citotóxicas contra o vírus, e o fato de este ser capaz de evadir dessa resposta, por causa dessa variabilidade genética, leva à cronicidade como uma característica importante dessa infecção (TAKAKI et al., 2010).

Quanto à transmissão, esta ocorre basicamente de forma parenteral, tendo como exemplo as transfusões sanguíneas e uso de hemoderivados. No entanto, o uso de drogas intravenosas, agulhas de acupuntura, tatuagens e, como alguns trabalhos relatam, em menor escala, a via sexual, são as formas de contágio mais atuais (STAUB, 1998; THOMSON; FINCH, 2005).

## 1.2. A INFECÇÃO E SUAS CARACTERÍSTICAS

A hepatite C crônica vem emergindo, progressivamente e de forma insidiosa, como uma doença comum que acomete principalmente indivíduos adultos, com idade entre 30-49 anos, o que significa que a transmissão ocorreu em um passado recente. O período de incubação após a infecção é, em média, de 50 dias, sendo raramente relatadas manifestações clínicas de doença aguda, enquanto que a elevação das enzimas hepáticas ocorre em, aproximadamente, metade dos indivíduos infectados pelo vírus (STAUB, 1998; RAMOS-CASALS et al., 2003; THOMSON; FINCH, 2005).

A doença crônica também está frequentemente associada a várias manifestações extra-hepáticas, perfazendo cerca de mais de 30 dessas manifestações (RAMOS-CASALS et al., 2003; THOMSON; FINCH, 2005). A primeira associação, da infecção crônica pelo VHC, com essas manifestações foi sugerida por Pascual et al (1990), quando foi relatado o achado de crioglobulinemia mista em dois portadores de hepatite C (FERRI et al., 2002; GALOSSO et al., 2007). Hoje já se sabe, de forma inequívoca, que esta é uma das manifestações que está estritamente relacionada com a infecção pelo vírus C, onde mais de 40% dos indivíduos infectados têm a presença de crioglobulinas no sangue periférico (THOMSON; FINCH, 2005).

De acordo com diferentes estudos, 40 a 74% dos indivíduos infectados podem desenvolver ao menos uma manifestação extra-hepática, durante o curso da doença, sendo que essas manifestações podem ser o primeiro sinal da mesma, já que a maioria desses indivíduos não apresenta sintomas hepáticos. Além disso, tecidos extra-hepáticos infectados podem atuar como reservatório para o vírus e ter um papel importante tanto na persistência da infecção quanto na sua reativação. Isso ocorre porque o vírus replica e expressa suas proteínas nesses tecidos, contribuindo para o aparecimento da manifestação extra-hepática associada à infecção pelo VHC (GALOSSO et al., 2007).

Dentre as diversas manifestações descritas, têm-se numerosas alterações imunológicas como: a presença de complexos imunes circulantes, manifestações autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide, tireoidite

autoimune, anemia hemolítica autoimune, desordens linfoproliferativas e a produção de autoanticorpos não-órgão específicos (CAULA et al., 2008).

A relevância clínica destes fenômenos é extremamente variável, indo desde características subclínicas a anomalias laboratoriais com ostensivas manifestações clínicas que podem ser graves em alguns pacientes (RAMOS-CASALS et al., 2003). Devido a isso, as manifestações extra-hepáticas na hepatite C crônica ocupam posição de destaque dentre as peculiaridades dessa infecção, principalmente porque a sua patogênese ainda não é devidamente elucidada e também, pelo fato de ser uma doença de caráter multissistêmico, que envolve uma resposta complexa do sistema imune do hospedeiro (FERRI et al., 2007; LANDAU et al., 2007).

### 1.3. MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS: PRODUÇÃO DE AUTOANTICORPOS

Entre as várias características, o vírus da hepatite C tem a propensão de induzir reações autoimunes, específicas e não-órgão específicas, estando associado a uma ampla gama de manifestações e/ou anormalidades autoimunes, incluindo a aumentada expressão de autoanticorpos não-órgão-específicos (NOSA) (CASSANI et al., 1997; AKASHI et al., 2002; MURATORI et al., 2003; GATSELIS et al., 2006; WILLIAMS et al., 2009).

Um estudo realizado no Estado da Bahia-Brasil demonstrou que uma das principais manifestações extra-hepáticas que evidenciam a autoimunidade, na hepatite C, é a produção de autoanticorpos, sendo esta encontrada em alta prevalência atingindo cerca de 80% dos portadores de HCC (SOUSA-ATTA et al., 2006). Ainda não é claro se estes autoanticorpos são uma consequência ou causa de dano hepatocelular, ou se são independentes dos efeitos do vírus no fígado (WILLIAMS et al., 2009), mas o que se sabe é que este vírus aparenta ser fortemente autoimunogênico, visto que numerosos autoanticorpos têm sido detectados em portadores do vírus C (CHRÉTIEN et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos nessa desregulação autoimune não estão totalmente esclarecidos, podendo estar relacionado à natureza linfotrópica do vírus (BELL et al., 1999) e ao mimetismo molecular entre suas poliproteínas próprias e antígenos do hospedeiro, levando a uma reatividade cruzada imunológica e à emergência de autoimunidade, além do indivíduo ser geneticamente susceptível (dependência do haplótipo do antígeno leucocitário humano - HLA), sendo dessa forma, mecanismos que dependem de fatores do vírus e do hospedeiro (GREGORIO et al., 2003; CAULA et al., 2008; HIMOTO; NISHIOKA, 2008).

O linfotropismo se deve à glicoproteína E2 do envelope do vírus C, que se liga aos receptores CD81, proteínas da família das tetraspaninas, presentes nos linfócitos B, promovendo a proliferação e expansão clonal dessas células, além de diminuir seu limiar de ativação, evocando dessa forma um potencial mecanismo patogênico que contribui para o aparecimento dos autoanticorpos não-órgão-específicos na hepatite viral C crônica (LEVY et al., 1998; MURATORI et al., 2003; STROFFOLINI et al., 2004; THOMSON; FINCH, 2005; CONCA; TARANTINO, 2009).

Além disso, alguns estudos têm mostrado que a detecção dos NOSAs correlaciona-se com o aumento significativo dos níveis séricos da enzima alanina aminotransferase (ALT) e alta atividade histológica (fibrose), além de predizer uma resposta desfavorável ao tratamento com antivirais; no entanto, ainda existem muitas controvérsias a respeito deste envolvimento dos anticorpos com a patogênese da hepatite C (STROFFOLINI et al., 2004; GATSELIS et al., 2005; GEHRING et al., 2006).

#### 1.4. ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO

Dentre os autoanticorpos produzidos durante essa infecção, os anticorpos antimúsculo liso (AML) têm sido os mais frequentemente detectados na hepatite C, mostrado por vários estudos, com frequências variando de 10% a 66% dos casos de

doença (CLIFFORD et al., 1995; BELL et al., 1999; BOGDANOS et al., 2005; CHRÉTIEN et al., 2009; WILLIAMS et al., 2009).

Em relação à gênese destes autoanticorpos, o grupo de Gregorio et al (2003) confirmou a hipótese do mimetismo molecular como mecanismo fortemente associado à geração do AML. O fato de poliproteínas do vírus da hepatite C dividir sequências homólogas com proteínas do hospedeiro, as quais são antígenos alvo deste autoanticorpo, propiciou o conhecimento sobre o papel da sua resposta, à infecção pelo VHC, como fator preponderante na síntese deste autoanticorpo. Dessa forma, no momento em que o indivíduo se infecta com o vírus, ele desencadeia uma resposta imunológica contra ele e contra antígenos próprios, sendo assim o desenvolvimento do AML faz parte do curso natural dessa doença.

Os AML foram inicialmente detectados em amostras de soros de pacientes com doenças do fígado por Johnson et al. em 1965 (BOGDANOS et al., 2008). Essa descoberta se deu através do uso de reações de imunofluorescência indireta em seções de estômago de roedores, como antígeno, com amostras de portadores de hepatite autoimune (MARTINEZ-NEIRA et al., 2008) e confirmados posteriormente por Whittingham et al. em 1966 (BOGDANOS et al., 2008).

Após a descoberta destes autoanticorpos, não só em doenças hepáticas, mas também em aproximadamente 12% de indivíduos saudáveis, em baixos títulos, a presença de AML foi também demonstrada, como um fenômeno temporário, em cerca de 80% de pacientes com infecções virais, especialmente hepatite infecciosa, além de outras infecções e doenças malignas, não necessariamente envolvendo o fígado (BOTAZZO et al., 1976; SILVESTRINI, BENSON, 2001).

A nomenclatura desses anticorpos deve-se à ligação a antígenos presentes nas células musculares lisas, principalmente em componentes do citoesqueleto, como a proteína actina, além de outros tecidos não musculares que, no entanto, tenham características semelhantes aos tecidos de musculatura lisa.

Isso pôde ser evidenciado com o trabalho de Gabbiani et al., em 1973, onde foi identificado a especificidade dos AML para a proteína actina, não apenas em células musculares lisas, mas também em outros tipos celulares. Dentre estes, tem-se como exemplos utilizados por esses autores: as plaquetas, que contêm uma proteína semelhante à proteína contrátil actina; células mesangiais dos glomérulos,

que contêm microfilamentos; e hepatócitos, onde pôde ser comprovado que na hepatite agressiva crônica, estas células liberavam as proteínas actina para o meio extracelular, levando à produção de anticorpos específicos para este componente, entre outras células. Foi dessa forma, que a identidade dos AML como um anticorpo “anti-actina” foi determinada, e muitos outros estudos foram sendo realizados para identificar outras especificidades dos AML (GABBIANI et al., 1973).

Com os crescentes avanços em relação aos conhecimentos sobre estes autoanticorpos, fez-se necessário uma classificação para os mesmos, já que, ao observar a presença deles através das reações de imunofluorescência indireta, usando cortes de tecido de rim de rato como substrato antigênico, notou-se que havia uma nítida diferença nos padrões de fluorescência, ou seja, na reatividade dos autoanticorpos para diferentes antígenos.

Foi em um estudo realizado por Bottazzo et al. em 1976, que documentou-se a diferença existente entre estes padrões, classificando-os de três formas: padrão de músculo liso englobando vaso (AML-v), onde a fluorescência era visualizada na musculatura lisa das paredes dos vasos sanguíneos, e envolvendo também a camada muscular da mucosa (AML-m) e fibras interglandulares (AML-f), a depender dos substratos antigênicos utilizados; padrão glomerular (AML-g), corando as células mesangiais dos glomérulos e paredes dos vasos; e padrão tubular (AML-t) corando fibrilas intracelulares das células tubulares renais, membranas basais tubulares e glomerulares e áreas peritubulares (BOTTAZZO et al., 1976; BRADWELL et al., 1997). Foi observado também, coloração em volta dos hepatócitos onde uma fluorescência de fibrilas no citoplasma de células hepáticas foi detectada, sendo este padrão denominado de poligonal ou bile-canalicular (FARROW et al., 1971; BOTTAZZO et al., 1976).

Com a determinação dos padrões de AML já devidamente conhecidos, e sabendo-se que a actina era até então, o antígeno alvo destes anticorpos, surgiram novos estudos no sentido de associar esses padrões de fluorescência com a especificidade do anticorpo.

O que começou a ser demonstrado foi que a reatividade de muitos anticorpos AML-t e AML-g era neutralizada pela actina, enquanto que no AML-v não era. Tornou-se evidente então, que os AML podiam ser específicos tanto para actina quanto para proteínas “não-actina”. Essa estratificação da reatividade pôde então

refletir diferentes especificidades dos anticorpos que poderia apresentar diferentes conotações diagnósticas (MARTINEZ-NEIRA et al., 2008).

A partir de então, novos estudos foram sendo realizados, que culminaram com a detecção e subsequente descrição de um novo tipo de AML, o qual reconhecia filamentos citoplasmáticos de diâmetro intermediário, e não só microfilamentos de actina. Portanto, novos componentes antigênicos foram sendo identificados, dentro do citoesqueleto celular e do sistema de fibras citoplasmáticas, envolvidos com a ligação dos AML. Estes componentes foram divididos em três tipos: microtúbulos (tubulina), filamentos intermediários (vimentina e desmina) e microfilamentos, sendo que estes últimos incluem os microfilamentos de actina e outros, como a miosina e vinculina.

Assim, a reação de imunofluorescência indireta para pesquisa dos AML ficou conhecida por detectar uma gama de anticorpos para autoantígenos celulares, no citoesqueleto de células musculares lisas e entre outros tipos celulares (SILVESTRINI, BENSON, 2001; SOARES et al., 2009).

Visto que já se havia reconhecido algumas moléculas para as quais os AML eram dirigidos, e sabendo-se da existência de alguns padrões de coloração tecidual produzidos por estes anticorpos, novos estudos puderam evidenciar que a presença destes diferenciava-se, de acordo com os padrões, nos diferentes tipos de doenças: em pacientes com hepatite autoimune (HAI), até então chamada de hepatite crônica ativa, os padrões de fluorescência mais frequentemente observados eram os padrões glomerulares e tubulares (onde o AML se direcionava, especificamente, para moléculas de actina) sendo os padrões vasculares mais prevalentes em hepatites de origem viral (BOTTAZZO et al., 1976; TOH, 1979; SILVESTRINI; BENSON, 2001; SOARES et al., 2009).

Não obstante, trabalhos posteriores vieram a pesquisar estes padrões de fluorescência, sendo confirmada a participação destes padrões de coloração imunohistoquímicos, de forma diferenciada, para os dois grupos de hepatites (BOGDANOS et al., 2008; MAKARITSIS et al., 2009; PAN; CRIPPIN, 2010). Ou seja, AML com padrões de fluorescência para túbulos e glomérulos, sendo associado a anticorpos “anti-actina”, foram considerados específicos para hepatite autoimune do tipo I (HAI-1), sendo utilizado como marcador altamente específico para o diagnóstico dessa doença. No entanto, anticorpos anti-actina-F (hoje já assim

determinada, devida a sua forma filamentar, após polimerização da sua forma globular) geralmente estão presentes em pacientes com hepatite autoimune que apresentam altos títulos de AML, podendo, contudo, estar presentes mesmo quando os títulos destes forem baixos (inferiores a 1/40) (CZAJA, 2008).

Ainda assim, 20% a 40% destes pacientes podem não apresentar positividade para anti-actina-F. Adicionalmente, outras doenças como a cirrose biliar primária, doença hepática alcoólica e doenças do tecido conectivo (KATONA et al., 2002) podem apresentar esta especificidade de AML, incluindo as hepatites virais, em cerca de 25% dos pacientes (BOGDANOS et al., 2008; CZAJA, 2008).

Portanto, embora os anticorpos antimúsculo liso tenham uma maior relevância no diagnóstico de hepatite autoimune do tipo I, a sua presença tem sido associada com vários outros estados patológicos, incluindo doenças infecciosas, autoimunes e neoplásicas. E como os AML, com reatividade para actina-F, demonstraram ser mais especificamente relacionados com a hepatite autoimune (MAKARITSIS et al., 2009; SOARES et al., 2009), é que a presença ou ausência deste anticorpo específico auxilia o médico na desfecho do diagnóstico da doença. No entanto, muitos laboratórios relatam a presença do AML, mas não fornecem a informação sobre a sua reatividade (SILVESTRINI, BENSON, 2001).

Na medida em que a identificação dos padrões de fluorescência dos AML, associado com a informação sobre suas especificidades estejam sendo realizadas, será possível um diagnóstico diferencial entre hepatites virais e hepatites autoimunes, tornando o teste mais preciso e utilizado como uma ferramenta importante para se determinar, diagnosticar e tratar corretamente a doença em si (CASSANI et al., 1997).

É importante ressaltar, que a infecção pelo vírus da hepatite C requer uma diferenciação precisa da hepatite autoimune em vista da terapêutica que será empregada (STRASSBURG et al., 2003). Para a maioria dos pacientes com hepatite autoimune, o tratamento de escolha são os glicocorticóides. Tal tratamento não é recomendado para pacientes com hepatite C crônica, pois este geralmente aumenta os níveis de viremia, provavelmente por favorecer o aumento da replicação viral. Contrariamente, a terapia com interferon- $\alpha$  não é geralmente recomendada para pacientes com hepatite autoimune, porque a estimulação imune produzida por tal tratamento leva à exacerbação da atividade da doença. Portanto, uma cuidadosa

distinção precisa ser feita entre essas duas doenças, visto que, muito frequentemente, pode ocorrer sobreposição dos achados clínicos, sorológicos e histológicos entre as duas hepatites (CLIFFORD et al., 1995; MCMURRAY; ELBOURNE, 1997; GEHRING et al., 2006; PAN e CRIPPIN, 2010) .

## 2. RELEVÂNCIA

A relevância deste estudo consiste na identificação e caracterização imunológica dos autoanticorpos antimúsculo liso na hepatite viral C crônica, possibilitando referências laboratoriais que permitam a diferenciação entre a hepatite C crônica e a hepatite autoimune. Além disso, a presença de determinado tipo de marcador extra-hepático de autoimunidade, na hepatite C, pode estar associado a manifestações clínicas, podendo ser considerado como fator de risco ou de melhor prognóstico na resposta ao tratamento.

Adicionalmente, com a introdução de novos testes de imunodiagnóstico usando antígenos altamente purificados, que não têm sido amplamente avaliados no Brasil, onde há alto grau de miscigenação populacional, não existem dados documentados na literatura sobre o perfil destes autoanticorpos em portadores de doenças hepáticas, especialmente na hepatite C, fazendo-se necessário a realização desta avaliação, trazendo novos dados e informações para a clínica especializada.

### 2.1. HIPÓTESE:

H<sub>1</sub>= A especificidade do anticorpo antimúsculo liso, nos portadores de Hepatite C crônica é diferente do que é relatado na Hepatite Autoimune.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar imuniquimicamente os anticorpos antimúsculo liso e avaliar a sua importância na imunologia da infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a prevalência de anticorpos antimúsculo liso e sua distribuição conforme o gênero na população estudada.
2. Caracterizar a reatividade sorológica dos anticorpos antimúsculo liso usando como referência os padrões de fluorescência previamente determinados.
3. Estabelecer as associações entre a reatividade sorológica dos anticorpos antimúsculo liso com os dados clínicos e laboratoriais dos portadores de hepatite C.
4. Caracterizar imuniquimicamente os anticorpos frente a antígenos purificados.

## **4. PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1. PACIENTES**

Neste estudo foram incluídos 100 indivíduos previamente diagnosticados de acordo com a clínica, a histopatologia e a sorologia, pertinentes aos portadores de hepatite viral C crônica, de ambos os sexos e sem tratamento antiviral prévio. Esse diagnóstico consistiu na avaliação clínica, bioquímica, sorológica (ELISA de 3ª geração para detecção de anticorpos anti-VHC), de biologia molecular (detecção do RNA viral pelo método de PCR e genotipagem), e de histopatologia de biópsia hepática pela classificação METAVIR. Como critérios de exclusão tinha-se que: os pacientes não podiam apresentar infecções concomitantes pelos vírus da hepatite B, HTLV e HIV, além do que, não podiam apresentar doenças crônicas autoimunes, hematológicas ou neoplásicas. Todos os pacientes incluídos foram procedentes do Ambulatório de Doenças Hepáticas do Complexo Hospitalar Hospital Universitário Professor Edgar Santos – C-HUPES, sob a coordenação do Prof. Dr. Raymundo Paraná.

Todos os participantes foram previamente informados sobre o estudo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme previsto na Res. CNS 196/96, e aprovação pelo Comitê de Bioética da FIOCRUZ-BA.

### **4.2. MÉTODOS**

#### **4.2.1. Obtenção das amostras**

Estas foram obtidas através da coleta de 10mL de sangue, a vácuo, sendo realizada no ambulatório referido acima. Após coagulação e separação do soro,

alíquotas eram separadas, das quais, uma seguia para processamento imediato, enquanto as demais eram armazenadas em refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

#### **4.2.2. Obtenção dos dados de genótipo e histopatologia**

Os dados da genotipagem e estadiamento da atividade necroinflamatória e de fibrose, nos pacientes de HCC, foram coletados através de análises dos prontuários médicos, obtidos no ambulatório referido acima. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com o sistema METAVIR (BEDOSSA et al., 1996).

#### **4.2.3. Determinação da atividade da enzima Alanina Aminotransferase (ALT)**

A medição foi realizada através da metodologia Cinética-UV, método este de referência proposto pela *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), utilizando conjunto comercial (Labtest Diagnóstica S.A, Brasil), sendo que as leituras das absorbâncias foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro Labmax 240 (Labtest Diagnóstica S.A, Brasil). Foram usados os seguintes valores de referência: 31 U/L e 41 U/L para os gêneros feminino e masculino, respectivamente.

#### **4.2.4. Pesquisa de Crioglobulinas (CRIOG)**

Foi realizada através de dois métodos, a crioprecipitação em tubo de Wintrobe e em gel de difusão. A coleta do sangue para esta pesquisa foi

diferenciada, sendo utilizado tubo sem anticoagulante e pré-aquecido a 37°C. Após coleta, o sangue foi mantido a 37°C para completa coagulação e retração do coágulo, seguido de centrifugação para obtenção do soro, e alíquotas eram, imediatamente, colocadas em tubo de Wintrobe e na placa para gel-difusão. No primeiro método, a formação ou não do crioprecipitado era observada até sete dias de incubação a 4°C. Caso houvesse a formação do mesmo, o tubo era incubado em banho-maria a 37°C por 1h, para reversão do crioprecipitado e confirmação do resultado. Já o segundo método foi utilizado para a pesquisa das crioglobulinas seguida da identificação dos isotipos de imunoglobulinas, conforme preconizado por Okazaki et al. (1998).

#### **4.2.5. Pesquisa de Fator Reumatóide (FR)**

A determinação quantitativa do fator reumatóide foi realizada nos soros, através do método de microaglutinação automatizada, usando-se o nefelômetro IMMAGE® (Beckman Coulter, USA), sendo o valor de referência usado de 20 UI/mL.

#### **4.2.6. Dosagem de Haptoglobina (HAP)**

A determinação quantitativa desta proteína de fase aguda também foi realizada nos soros, através do método de nefelometria automatizada, usando-se o nefelômetro IMMAGE® (Beckman Coulter, USA), sendo o valor de referência usado de 30 – 200 mg/dL.

#### **4.2.7. Dosagem de Imunoglobulina G total sérica (IgG)**

A determinação quantitativa, nos soros, foi também realizada através do método de nefelometria automatizada, usando-se o nefelômetro IMMAGE® (Beckman Coulter, USA), sendo o valor de referência para adulto de 600 – 1.500 mg/dL.

#### **4.2.8. Determinação de Anticorpos Antinúcleo (ANA)**

Foi realizada através do método de imunofluorescência indireta (IFI) usando conjunto comercial (Viro-Immun, Labor-Diagnostika GmbH, Alemanha), tendo como substrato antigênico células HEp-2 e a diluição inicial de triagem dos soros dos pacientes foi de 1/40 em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4). O conjugado de anticorpos anti-IgG humana marcados com isotiocianato de fluoresceína é previamente diluído e pronto para uso. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio para imunofluorescência (Opton), usando objetiva de 40x. As amostras positivas tiveram o padrão de reatividade determinado conforme preconizado (homogêneo, pontilhado grosso/fino, nucleolar ou centromérico), e a titulação dos anticorpos, em UI/mL, era obtida por método imunoenzimático (ELISA), usando conjunto comercial (The Binding Site, Birmingham, UK), tendo como valor de referência positivo títulos > 10 UI/mL.

#### **4.2.9. Determinação e Caracterização de anticorpos antimúsculo liso (AML)**

Foi realizada através do método de IFI, usando conjunto comercial IFA Anti-LKM IgG (Viro-Immun Labor Diagnostika GmbH, Alemanha), tendo como substrato antigênico cortes teciduais de estômago, rim e fígado de rato. A triagem das amostras iniciou-se com a diluição dos soros a 1/20 em PBS (pH 7,4). Amostras

positivas foram tituladas até o ponto final onde era encontrada positividade. A presença dos autoanticorpos específicos foi determinada pela formação de um complexo imune entre o autoanticorpo (presente ou não no soro) e o conjugado anti-IgG humana ligado ao isotiocianato de fluoresceína. A visualização deste complexo, com a formação da coloração verde maçã nas reações positivas, foi realizada no microscópio de fluorescência (Opton), usando as objetivas de 20x e 40x. Foi considerada a diluição de 1/40 como valor de referência para positividade.

#### **4.2.10. Caracterização imunológica dos anticorpos antimúsculo liso**

Foi realizada através do método de imunoblot, usando conjunto comercial disponível *Liver-7-Line* (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Alemanha), no qual antígenos alvos altamente purificados estão fixados em membrana, para a detecção qualitativa e semiquantitativa dos seguintes autoanticorpos: AMA-M2 (antiantígeno mitocondrial do subtipo M2), anti-SLA/LP (antiantígeno solúvel de fígado/antígeno de fígado-pâncreas), anti-LKM 1 (antiantígeno microsomal de fígado-rim tipo 1), anti-LC1 (antiantígeno citosólico do fígado do tipo 1), anti-actina-F, antidesmina e antimiosina.

A diluição utilizada foi de 1/101 e foram selecionadas as amostras previamente positivas por IFI, para anticorpo antimúsculo liso, com título igual ou superior a 1/40, assim como algumas amostras com títulos até 1/20, amostras negativas, amostras com outras doenças autoimunes e amostras de indivíduos saudáveis, para posterior comparação. Posteriormente, seguiu-se com a adição do conjugado composto de IgG de coelho anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina e revelação da reação com a solução do substrato pronta para uso de BCIP/NBT (fosfato de 5-bromo-4-cloro-indolil/ nitroblue tetrazólio). Uma reação positiva consiste no aparecimento de bandas de cor púrpura, na membrana de nitrocelulose, nas regiões equivalentes aos antígenos alvo específicos, cuja intensidade seja superior à banda do *cut-off*.

A obtenção dos resultados foi feita mediante a identificação das bandas e análise das suas intensidades, através do escaneamento das fitas do imunoblot utilizando para isso um programa específico para análises dos testes, próprio do conjunto comercial (iVISION<sup>®</sup> Scanware, ORGENTEC; Diagnostika GmbH), sendo essas análises computador-assistidas. Através desse escaneamento, o próprio programa calcula um valor de índice para medir a intensidade de cor da reação, frente aos antígenos da fita, calculando uma razão entre a intensidade de cor da banda das amostras e a banda do *cut-off* de cada fita individualmente. Este valor do índice obtido é que foi analisado para medir positividade ou negatividade das amostras perante os autoanticorpos.

#### **4.2.11. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas através do programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., USA). As variáveis analisadas nos grupos estudados foram expressas em média  $\pm$  desvio padrão (SD) ou mediana com intervalo interquartil (IQR), a depender do tipo de distribuição obtida com as amostras. As associações entre grupos categóricos foram avaliadas por tabelas de contingência (teste exato de Fisher ou de Chi-Quadrado). O nível de significância estatística foi estabelecido no valor de  $P < 0,05$ , com intervalo de confiança de 95% para cada variável analisada. Para análise dos resultados obtidos no imunoblot, usou-se uma padronização com novo cálculo de *cut-off*, baseado em 12 amostras de controles sadios e IC 95%, utilizando o método de Frey (FREY et al., 1998)

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Este estudo avaliou 100 portadores de hepatite C crônica, sendo 55 homens e 45 mulheres, com média de idade de  $47 \pm 12$  anos (variação 13 - 73 anos). A partir dos dados obtidos de genotipagem, inferiu-se que 67% dos pacientes apresentavam infecção com vírus do genótipo tipo 1; 8% apresentavam o tipo 2, e 25% portadores do tipo 3. Já em relação ao estadiamento da hepatite crônica, de acordo com a classificação METAVIR (atividade/fibrose), teve-se que 66% destes pacientes apresentavam desde ausência de fibrose (F0) a graus considerados leves (F1 e F2), sendo 33 homens e 33 mulheres. Quanto à fibrose de grau avançado (F3 e F4), 34% dos pacientes apresentavam esta classificação, sendo 22 homens e 12 mulheres.

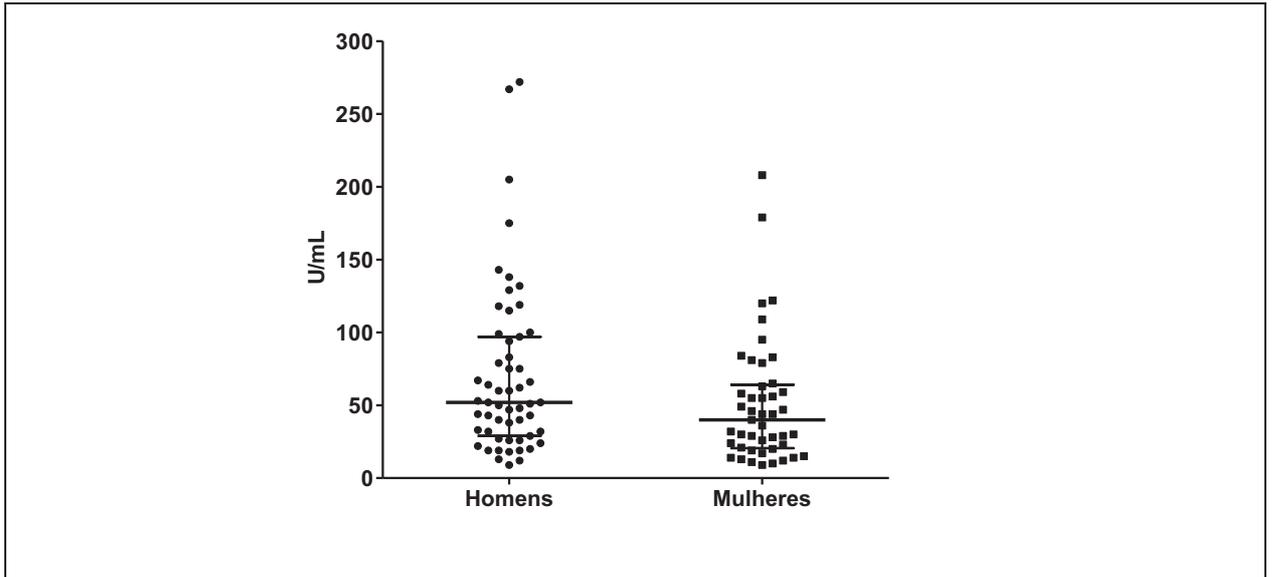
A atividade necroinflamatória (A), ainda de acordo com a classificação METAVIR, foi analisada em 96 pacientes, sendo 34 classificados como A0, 32 como A1, 27 A2 e três com A3. Os dados acima estão discriminados na Tabela 1.

A caracterização laboratorial dos pacientes, quanto aos parâmetros séricos de ALT, haptoglobina e IgG, estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. Neste grupo de pacientes, 60% apresentavam níveis elevados de ALT, em relação aos respectivos valores de referência, sendo estes 35 homens e 25 mulheres. Na avaliação quantitativa da haptoglobina, verificou-se que 26% destes pacientes apresentaram valores diminuídos da haptoglobina sérica, considerando o valor mínimo de referência dessa proteína, e 11% tinham valores abaixo do nível de detecção do método ( $< 5,83$  mg/dL). Em relação aos níveis séricos de IgG, tivemos duas amostras do grupo de mulheres que foram insuficientes para a dosagem. No entanto, os níveis séricos desta imunoglobulina estiveram aumentados em relação ao valor de referência, em 68% dos indivíduos, sendo, respectivamente, 36 homens e 32 mulheres. Em contrapartida, apenas três pacientes apresentaram níveis abaixo do valor de referência ( $< 600$  mg/dL), sendo estes dois do gênero masculino e um feminino.

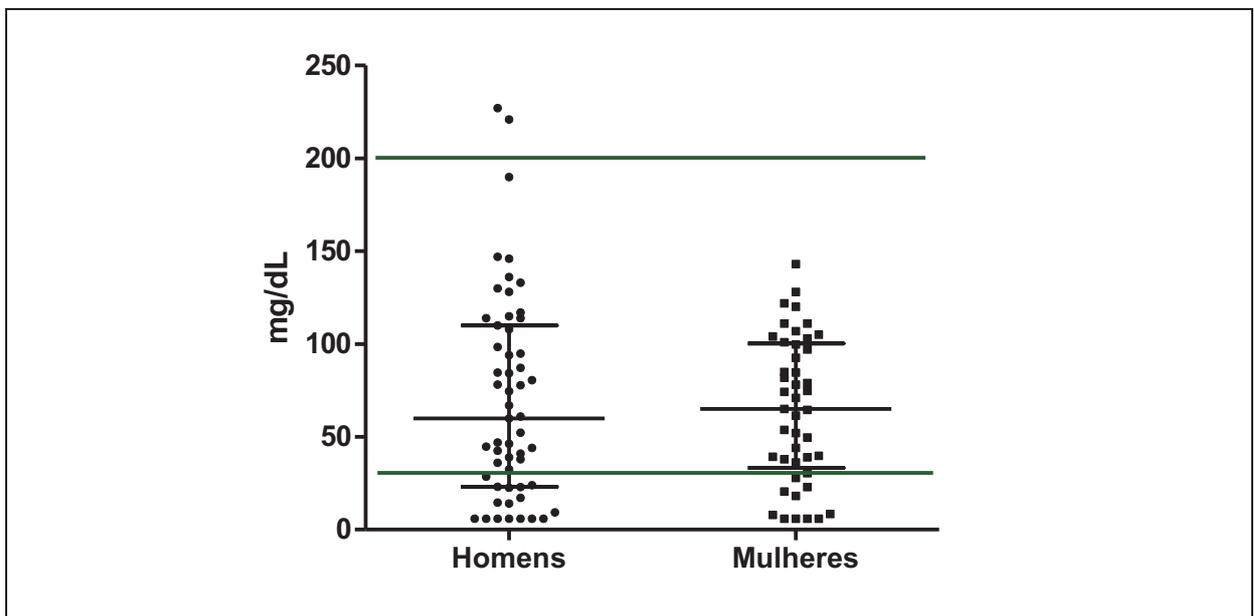
Anticorpos antinucleares estavam presentes em 12% dos portadores de HCC. A presença de fator reumatóide ocorreu em 57% desses indivíduos, enquanto a crioglobulinemia foi detectada em 44% deles. A Figura 4 mostra a distribuição desses marcadores laboratoriais de autoimunidade, conforme o gênero.

**Tabela 1 – Características demográficas e da infecção dos 100 indivíduos portadores de hepatite C crônica.**

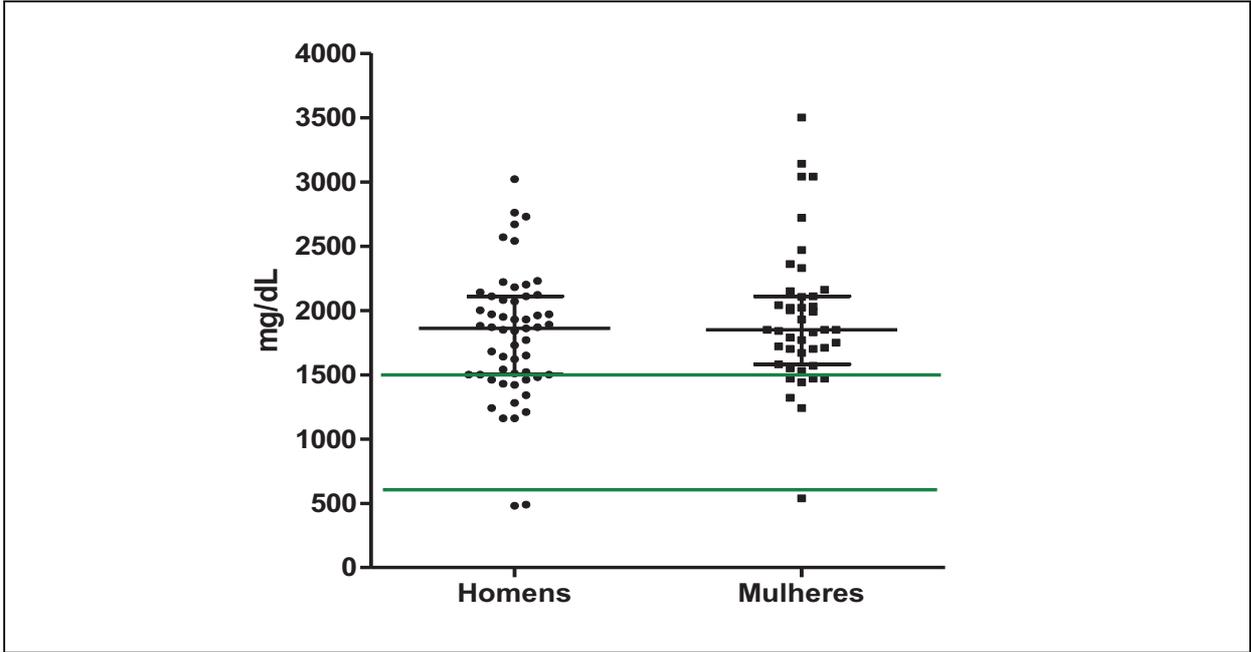
<b>Características</b>	<b>N (%)</b>
<b>Gênero</b>	
Homens	55/100 (55%)
Mulheres	45/100 (45%)
<b>Idade (anos), média ± dp</b>	<b>47 ± 12</b>
Homens	47 ± 11
Mulheres	48 ± 12
<b>Genotipagem</b>	
Genótipo 1	67/100 (67%)
Genótipo 2	8/100 (8%)
Genótipo 3	25/100 (25%)
<b>Histopatologia (METAVIR)</b>	
<b>F0 - F2</b>	<b>66%</b>
F0	8/100 (8%)
F1	23/100 (23%)
F2	35/100 (35%)
<b>F3 - F4</b>	<b>34%</b>
F3	19/100 (19%)
F4	15/100 (15%)
<b>A0</b>	34/96 (35%)
<b>A1</b>	32/96 (33%)
<b>A2</b>	27/96 (28%)
<b>A3</b>	3/96 (3%)



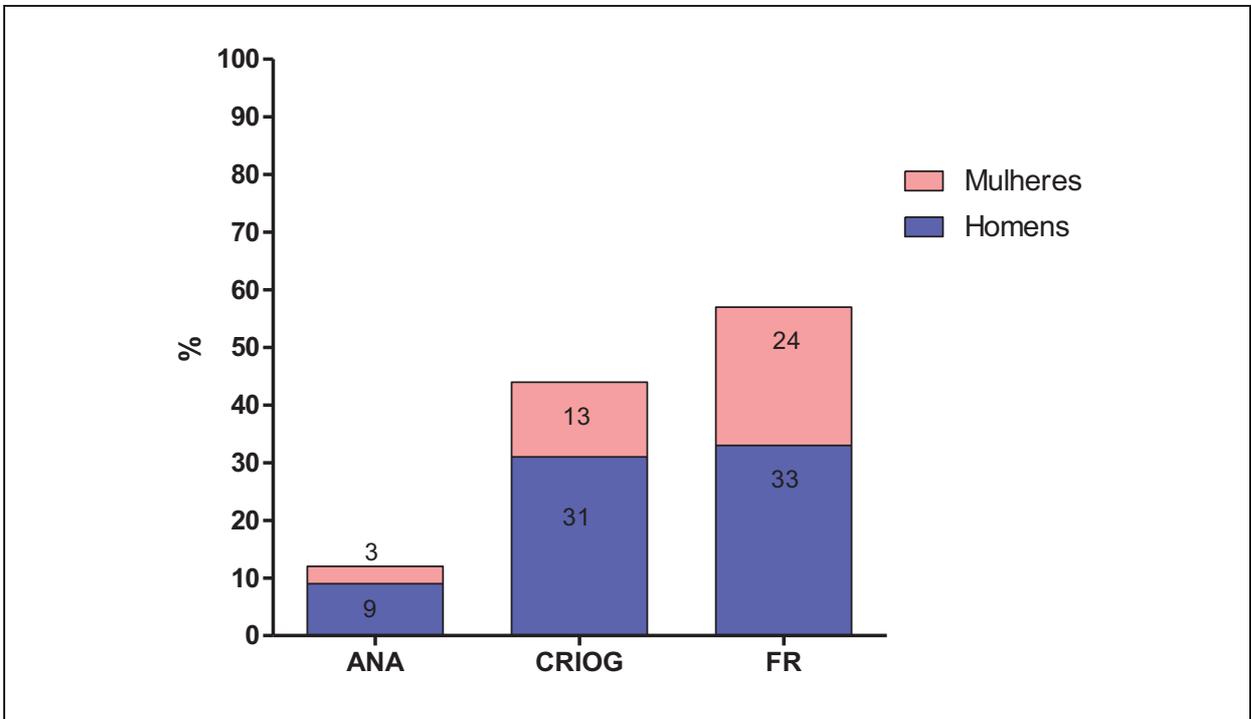
**Figura 1** - Níveis séricos de ALT em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. Valores de referência: 41 U/L para Homens e 31 U/L para Mulheres. As barras representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.



**Figura 2**- Níveis séricos de Haptoglobina em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. As linhas verdes representam os valores de referência mínimo e máximo. As barras pretas representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.



**Figura 3** - Níveis séricos de Imunoglobulina G (IgG) em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. As linhas verdes representam os valores de referência mínimo e máximo (600 – 1.500 mg/dL). As barras pretas representam a mediana e IQR.  $P > 0,05$ , Teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.



**Figura 4** - Marcadores laboratoriais de autoimunidade em 100 portadores de HCC, distribuídos conforme o gênero. Fonte: Ilustração da autora.

## 5.2. PESQUISA DE AUTOANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO

A detecção e identificação dos padrões de anticorpos antimúsculo liso foram baseadas conforme preconizado por Bottazzo et al. (1976), sendo realizadas cegamente por dois observadores independentes.

O método de IFI realizado partindo-se de uma diluição inicial de triagem de 1/20 revelou positividade em 61% dos pacientes, sendo 27 mulheres e 34 homens.

Dentre os padrões de fluorescência relatados na literatura, foram detectados os seguintes padrões: AML-v, AML-m, AML-f e AML-g, sendo que o padrão AML-v foi o mais prevalente (84%), estando presente em 51/61 dos pacientes positivos para o AML, sendo 30 homens e 21 mulheres. O padrão AML-m foi o segundo mais observado (74%) ocorrendo em 45/61 pacientes, sendo estes 27 homens e 18 mulheres. O padrão AML-g ocorreu em 57%, correspondendo a 35/61 pacientes, sendo estes 17 homens e 18 mulheres, e o padrão AML-f, o menos prevalente, ocorreu em 8%, ocorrendo em 5/61 pacientes, sendo estes quatro homens e apenas uma mulher. A tabela 2 apresenta estes dados sumarizados.

**Tabela 2 – Caracterização dos padrões de fluorescência dos AML na triagem a 1/20.**

Padrão de fluorescência	Positivos 1/20	Gênero H/M
Vaso (AML-v)	51/61 (84%)	30/21
Muscular da mucosa (AML-m)	45/61 (74%)	27/18
Glomerular (AML-g)	35/61 (57%)	17/18
Fibras interglandulares (AML-f)	5/61 (8%)	4/1

Seguida a etapa inicial de triagem, as amostras positivas eram tituladas até obter-se a diluição final onde se observasse positividade. Dos 61 pacientes, a priori, positivos a 1/20, 21 foram positivos com títulos maiores ou iguais a 1/40, perfazendo um total de 21%. Destes 21 pacientes, 11 foram homens e dez foram mulheres.

Considerando os padrões de fluorescência observados, o padrão AML-v continuou sendo o mais prevalente com 81% (17/21) dos pacientes, sendo nove

homens e oito mulheres. Em seguida, teve-se o padrão AML-m perfazendo 76% (16/21), correspondendo a oito homens e oito mulheres. O padrão AML-g ocorreu em 24% (5/21), sendo três homens e duas mulheres. Quanto à presença de AML-f, este padrão foi observado em dois pacientes, perfazendo 9,5% do total. Dados acima são referidos na Tabela 3.

**Tabela 3 – Caracterização dos padrões de fluorescência dos AML na diluição de 1/40.**

Padrão de fluorescência	Positivos a 1/40	Gênero H/M
Vaso (AML-v)	17/21 (81%)	9/8
Muscular da mucosa (AML-m)	16/21 (76%)	8/8
Glomerular (AML-g)	5/21 (24%)	3/2
Fibras interglandulares (AML-f)	2/21 (9,5%)	1/1

Os padrões dos anticorpos antimúsculo liso, comumente, vêm associados uns aos outros. Neste grupo de pacientes, na diluição de 1/20, a associação entre os padrões AML-v, AML-m e AML-g foi a mais prevalente, com 39% (24/61). A segunda associação mais prevalente foi entre os padrões de vaso e o da muscular da mucosa, com 31% (19/61).

Considerando a diluição de 1/40, verificou-se que a associação entre os padrões AML-v e AML-m foi a mais detectada, com 71% (15/21), enquanto que apenas um paciente apresentou a associação dos três padrões referidos acima. Estes dados são mostrados na tabela 4.

**Tabela 4 – Associação dos padrões de fluorescência dos AML.**

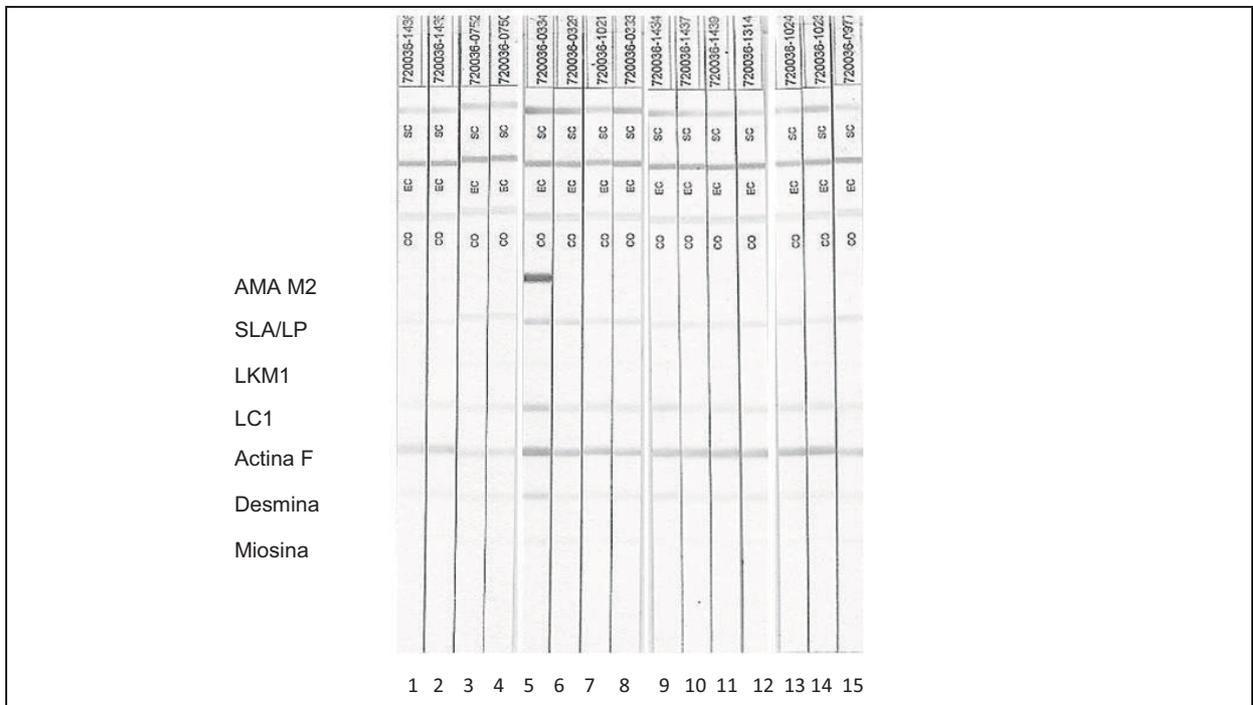
Associação	Prevalência a 1/20 % (n)	Prevalência a 1/40 % (n)
AML-v + AML-m	31 (19/61)	71 (15/21)
AML-v + AML-m + AML-g	39 (24/61)	5 (1/21)

Apenas quatro amostras reagiram positivamente até as diluições de 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640, apresentando os seguintes padrões, respectivamente: AML-v apenas; padrões AML-v+AML-m+AML-g, sendo esta a única amostra com padrão glomerular observado até este título; AML-v+AML-m; e essa última, a única amostra

com padrão exclusivamente de fibras interglandulares. Já o padrão tubular, citado na literatura, não foi observado neste grupo de pacientes.

### 5.3. DETERMINAÇÃO DO PERFIL IMUNOQUÍMICO DOS ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO

A caracterização imunoquímica dos AML foi feita através do método de imunoblot, seguindo as referências do protocolo. Para validar cada ensaio, é necessário que, após a execução do teste, apareçam bandas específicas no início da fita, que representam o controle da amostra (SC), do conjugado (EC) e do *cut-off* (CO), e que estas três bandas apareçam em conjunto. A terceira banda ou *cut-off* auxilia na verificação e identificação das amostras positivas ou negativas, baseado na intensidade da cor. A Figura 5 mostra alguns resultados obtidos no imunoblot, inclusive com a inclusão de amostras de outras doenças hepáticas como ilustração.

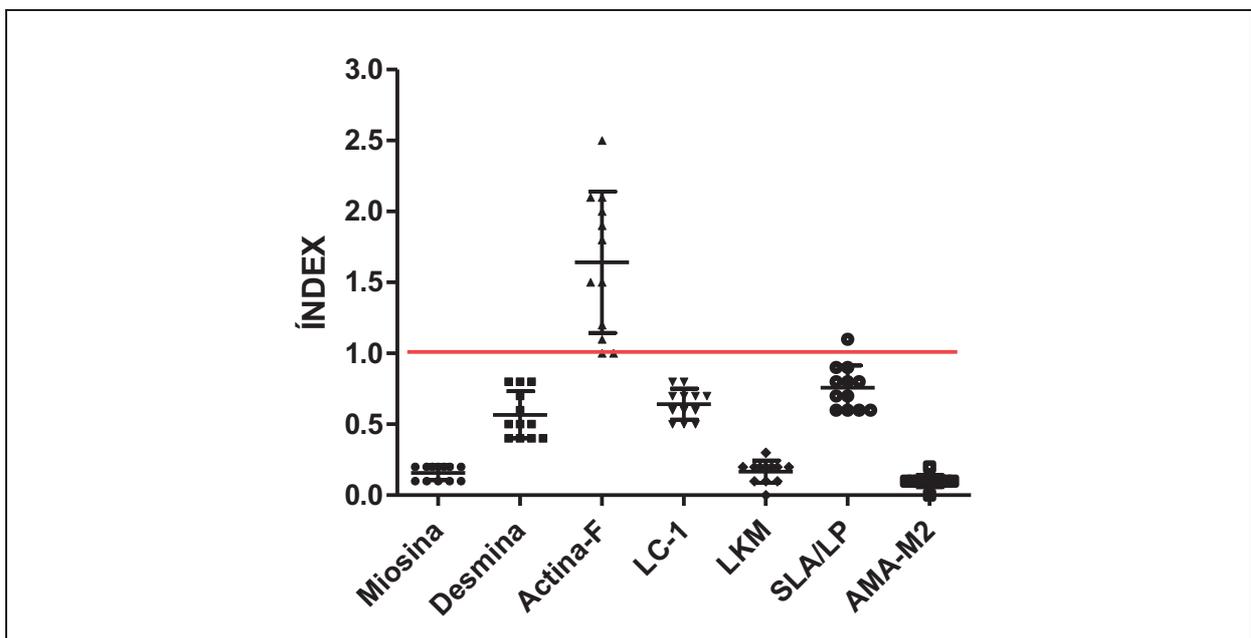


**Figura 5** - Imunoblot (Liver-7-Line, Orgentec, Diagnostika GmbH) de indivíduos sadios (1 - 4) e portadores das seguintes patologias: cirrose biliar primária (5), hepatite autoimune (6 - 8), HCV AML-negativos (9 - 12), HCV AML+ 1/80 (13) HCV AML+ 1/160 (14) e HCV AML+ 1/320 (15).

Fonte: Ilustração da autora.

Os resultados foram inicialmente analisados por inspeção visual e finalmente pelo uso do programa iVision® (Orgentec, Diagnostika GmbH), que permite resultados semi-quantitativos. Com o escaneamento das fitas, o programa calcula um índice baseado na intensidade de cor dos *cut-offs* de cada fita, sendo este ajustado ao valor de 1,0. O programa considera como positivas, as amostras que tenham valor de índice igual ou superior a 1,2, amostras negativas com índice abaixo ou igual a 0,7, e classifica como indeterminado valores de índice entre 0,8 e 1,1.

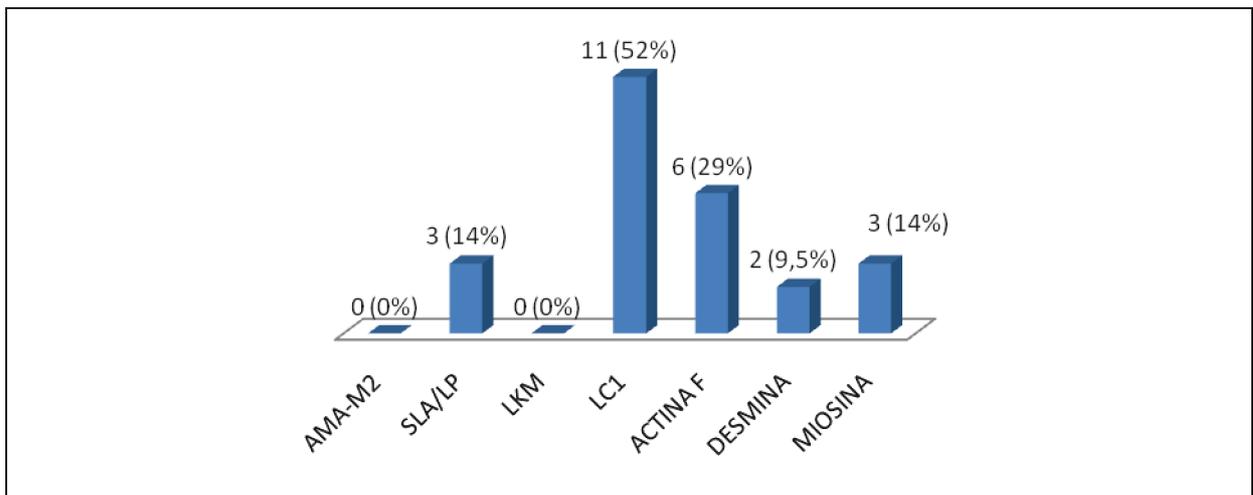
Devido à elevada sensibilidade do método, evidenciada com a grande reatividade em amostras de indivíduos sadios de nossa população (Fig. 6), frente os autoanticorpos, foi feito um novo cálculo de *cut-off*, através do método estatístico de Frey et al. (1998). Utilizou-se um grupo controle sadio, composto de 12 indivíduos, para que assim, com 95% de confiança, estes novos valores de *cut-offs* melhor discriminassem a população em estudo. Estes cálculos foram feitos para os seguintes antígenos: SLA/LP= 1,1; LC1= 0,9; Actina-F= 2,6; Desmina= 0,9 e Miosina= 0,3.



**Figura 6** - Reatividade de 12 amostras de soros de indivíduos sadios doadores de banco de sangue frente a antígenos do fígado altamente purificados através da metodologia de imunoblot (*Liver-7-Line*, Orgentec, Diagnostika GmbH).  
Fonte: Ilustração da autora.

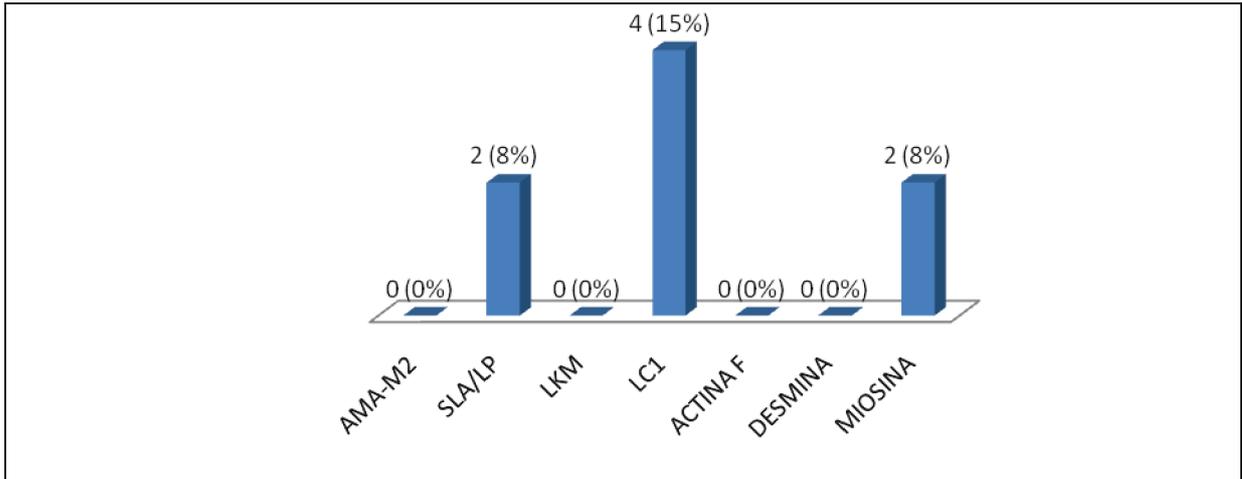
Foram avaliadas 47 amostras de portadores de HCC no imunoblot: 21 eram positivas para AML com título igual ou superior a 1/40 e 26 eram negativas para

esse mesmo autoanticorpo (<1/40). Dentre as amostras positivas para AML, 52% apresentaram reatividade para o anticorpo anti-LC1 (11/21 pacientes). A reatividade para actina-F foi a segunda mais prevalente com 29% das amostras (6/21 pacientes). Os anticorpos antimiosina e anti-SLA/LP apresentaram ambos com 14% (3/21 pacientes para cada tipo de anticorpo) e antidesmina estiveram presentes em 9,5% das amostras (2/21 pacientes). Não foi detectado reatividade para os anticorpos anti-LKM1 e AMA-M2 em nenhuma das amostras desse grupo de pacientes. Estes dados estão sumarizados na Figura 7.



**Figura 7** - Especificidade determinada por imunoblot (Liver-7-Line, Orgentec, Diagnostika GmbH) de autoanticorpos para antígenos purificados do fígado em 21 amostras de soro de portadores do HCC com presença de AML com título igual ou superior a 1/40, avaliados por imunofluorescência em cortes de tecido de estômago/rim/fígado de rato.  
Fonte: Ilustração da autora.

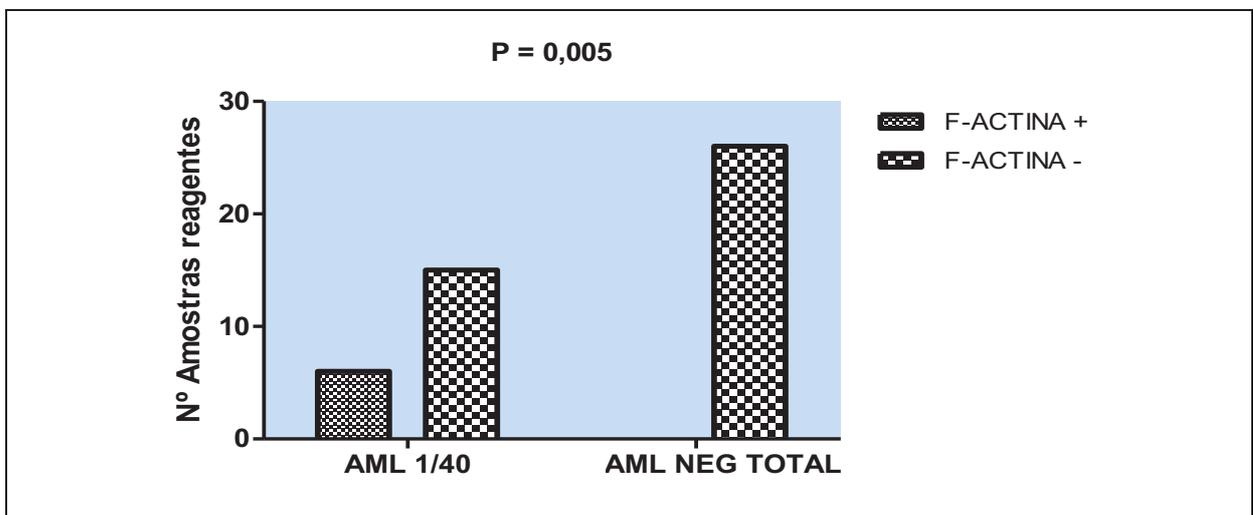
Entre os portadores de HCC com AML negativo, 15% apresentaram positividade para o anticorpo anti-LC1 (4/26 pacientes). Os anticorpos anti-SLA/LP e antimiosina foram detectados em 8% das amostras (2/26 pacientes cada). Anticorpos anti-actina F, antidesmina, anti-LKM e AMA-M2 não foram encontrados neste grupo de portadores de HVC. Estes dados são mostrados na Figura 8.



**Figura 8** – Especificidade determinada por imunoblot (Liver-7-Line, Orgentec, Diagnostika GmbH) de autoanticorpos para antígenos purificados do fígado em 26 amostras de soro de portadores de HCC com ausência de AML, avaliados por imunofluorescência em cortes de tecido de estômago/rim/fígado de rato. Fonte: Ilustração da autora.

Ao analisar a presença dos AML frente aos antígenos actina-F, desmina e miosina, obteve-se associação, estatisticamente significativa, somente em relação ao antígeno de actina-F ( $P = 0,005$ , teste exato de Fisher, Fig. 9). Já para os demais antígenos, não houve associação significativa.

Os parâmetros de genótipo, estágio de fibrose, atividade necroinflamatória e laboratoriais (bioquímicos e marcadores de autoimunidade) dos pacientes foram analisados estatisticamente, em relação à presença dos anticorpos antimúsculo liso, mas não foram encontrados dados significativos.



**Figura 9** - Associação entre a presença de AML e anticorpos anti-actina F detectados por imunoblot (teste exato de Fisher).

Fonte: Ilustração da autora.

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a prevalência dos anticorpos antimúsculo liso e suas características, quanto ao padrão de fluorescência e em relação à sua reatividade frente a antígenos purificados, além de ter associado estes achados com os dados clínicos e laboratoriais, em um grupo de portadores de HCC, na Bahia.

O anticorpo antimúsculo liso, apesar de ter sido descrito em 1965, ainda exibe dificuldade na sua identificação, muito por falta de padronização do método de imunofluorescência indireta, devido à falta de soros de referência, além da dependência de observador experiente na interpretação dos resultados.

Isso também ocorre visto que a detecção destes autoanticorpos ainda não é muito frequente, e geralmente, faltam dados clínicos suficientes, que auxiliem o diagnóstico por parte do laboratório (GRANITO et al., 2006; SOARES et al., 2009).

Embora a detecção de anticorpos antimúsculo liso seja frequentemente associada ao diagnóstico laboratorial de hepatite autoimune, tem-se observado positividade em outras patologias, como na hepatite C.

Neste trabalho, a aparente ausência de associação significativa entre os AML com os estadiamentos da histopatologia (atividade necroinflamatória/fibrose) e com os marcadores laboratoriais bioquímicos (dosagens de ALT, HAP e IgG) e de autoimunidade (crioglobulinas, FR e FAN), permite concluir que este autoanticorpo não está associado à lesão tecidual, sendo, portanto, decorrente da ativação policlonal induzida pelo VHC. No entanto, esses marcadores são incluídos no protocolo de avaliação dos portadores de HCC, para seguimento da evolução da doença e tratamento dos pacientes.

Quanto aos padrões de fluorescência encontrados para os AML, os padrões de AML-v e AML-m foram os mais detectados, estando de acordo com outros trabalhos envolvendo portadores do VHC (GRANITO et al., 2006).

Foi percebido que ao fazer a diluição inicial de triagem de 1/20, a detecção do padrão AML-g, foi bastante prevalente quando comparada com a diluição de 1/40. O que permite inferir que ao utilizar uma diluição mais baixa, o nível de especificidade cai, consideravelmente, visto que em portadores de HCC, este é um padrão

difícilmente observado; o contrário do que é visto em portadores de hepatite autoimune (MAKARITSIS et al., 2009).

Dessa forma, usando-se a diluição de 1/20 aumenta-se a sensibilidade em detrimento da especificidade, o que justifica que 1/40 seja o título referencial usado tanto na clínica, quanto na pesquisa; porém, alguns trabalhos também utilizam essa diluição mais baixa, como triagem (CLIFFORD et al., 1995; GREGORIO et al., 2003).

A execução do método de imunoblot permitiu detectar a presença de diferentes autoanticorpos para proteínas que são antígenos alvos descritos mais especificamente na hepatite autoimune, mas também nas hepatites virais, como no caso da hepatite C. No entanto, apenas três delas são bem documentadas como relacionadas ao músculo liso: a actina-F, a desmina e a miosina.

Neste trabalho, os portadores de HCC com AML positivo apresentaram reatividade para esses três distintos antígenos alvos, em diferentes proporções (29% para actina-F, 14% para miosina e 9,5% para desmina), enquanto que pacientes com ausência para esses autoanticorpos só apresentaram reatividade fraca para miosina e de forma menos prevalente (8%). Além disso, é interessante ressaltar que nem todos os pacientes com AML positivo apresentaram reatividade para esses três antígenos presentes no imunoblot.

A parcela de indivíduos com AML positivo e que não apresentaram especificidade para pelo menos um desses três antígenos, presentes no imunoblot, possivelmente reage a outros, como os filamentos intermediários do citoesqueleto celular, da musculatura lisa, vimentina e esmotelina, sendo esta última, uma proteína exclusivamente expressa em células da musculatura contrátil lisa, que é considerada, por alguns autores, como um marcador mais específico para os AML (GREGORIO et al., 2003).

A esmotelina foi descoberta pelo grupo de Guillaume et al. (1997) e a sua expressão está intimamente ligada à musculatura lisa das paredes dos vasos sanguíneos, padrão de fluorescência este que foi o mais observado na IFI, em 81% das amostras positivas para AML.

Essa proteína foi identificada e caracterizada como um novo marcador para células da musculatura lisa, com grande afinidade para actina, demonstrando assim, também o seu papel como proteína contrátil (GUILLAUME et al., 1997).

Provavelmente, se tivéssemos disponível no conjunto comercial a presença da esmotelina, teríamos encontrado uma presença relevante de AML reativos para essa proteína.

Diferentemente do que é visto na literatura, a ocorrência de reatividade para actina-F foi maior do que observado para os demais antígenos (desmina e miosina), embora não tenha sido uma prevalência alta. Corroboramos com o fato de que as amostras desse estudo apresentaram baixa ocorrência do padrão glomerular na IFI, e nenhum tubular; padrões estes fortemente associados com reatividade para essa proteína (SOARES et al., 2009).

Geralmente, os AML de portadores de HCC são mais direcionados para os filamentos intermediários do que microfilamentos, como a actina-F; no entanto, estes autoanticorpos, com essa reatividade, podem ser encontrados em baixos títulos, nesse grupo de pacientes, assim como em indivíduos saudáveis, ou em pacientes com diferentes tipos de infecções, neoplasias ou doenças autoimunes sistêmicas (ANDRADE et al., 2011). Dessa forma, o fato de termos encontrado positividade para actina-F está de acordo com outros trabalhos.

Outro dado que deve ser avaliado é o fato de dois pacientes com HCC AML positivo, para a presença de fibras interglandulares, terem respondido para actina-F. Isto demonstra que muito possivelmente, essa rede de fibras seja rica em microfilamentos de actina-F.

Apesar de não termos encontrado amostras negativas para AML com reatividade para actina-F, outros trabalhos mostraram essa ocorrência. Granito et al. (2006) relataram positividade para actina-F, em pacientes com HCC e AML negativos, e Toh et al. (2009) também detectaram, porém em pacientes sem HCC. Além destes, Muratori et al. (2003), mostraram a ocorrência de reatividade para os antígenos miosina, esmotelina e vimentina em 47% dos pacientes que também não apresentavam AML positivo, assim como aqui onde foi verificada positividade para miosina (8%) nos pacientes com HCC e AML negativo.

Embora tenha havido uma associação estatisticamente significativa entre a presença de AML e a actina-F, corroborando nossos achados cuja maior reatividade encontrada no imunoblot foi para este antígeno (29% das amostras); os padrões de fluorescência mais encontrados em nosso estudo (vaso e mucosa) não são

específicos para essa proteína. Dessa forma, não se pode inferir que os AML reativos para esta proteína estejam relacionados aos padrões glomerulares e, principalmente, tubulares, pelo menos em nossa população, dificultando a caracterização de hepatite autoimune e hepatite C.

O padrão AML-v, como já descrito, está associado a várias desordens virais, a exemplo da hepatite C e tem sido relacionado a anticorpos que reconhecem outras estruturas do citoesqueleto, que não sejam os microfilamentos contendo actina. Geralmente, este padrão reconhece filamentos intermediários de 10nm, como é o caso da desmina (CASSANI et al., 1997; TOH et al., 2009).

A associação realizada aqui entre a presença do AML e esta proteína não forneceu resultados significativos. Em relação à miosina, também não houve associação. No entanto, visto que esta última é um microfilamento, ela não é considerada específica para o padrão AML-v, o qual foi encontrado em maior proporção no nosso estudo. No entanto, em relação à desmina, a explicação provável, reside no fato do nosso tamanho amostral, e nas características inerentes da nossa população. Possivelmente, com um número maior de pacientes, essa associação se tornasse estatisticamente significativa, corroborando com a grande parte dos relatos científicos sobre a reatividade dos AML frente a esse antígeno, na hepatite C crônica.

Outro autoanticorpo detectado pelo imunoblot foi o anti-SLA/LP, estando presente tanto em pacientes com AML positivo quanto negativo (11% vs 10%).

Esse anticorpo é encontrado, preferencialmente, em portadores de hepatite autoimune do tipo 1 (HAI-1), podendo também vir associado com os anticorpos AML e ANA (ZACHOU et al., 2004). No entanto, a maior parte dos trabalhos não relata esse autoanticorpo em populações portadoras de hepatite C (MIYAKAWA et al, 2003; ZACHOU et al., 2004), sendo considerado por isso, um marcador diagnóstico específico para HAI-1. Entretanto, Invernizzi et al. (2007) explicitaram em seu trabalho a presença desse anticorpo na hepatite C crônica, porém em baixos títulos, assim como no trabalho de Muratori et al. (2010). Outro estudo no Reino Unido mostrou a ocorrência de anticorpos anti-SLA/LP em HAI-2 e colangite esclerosante primária; dessa forma, a exata função e o papel desses autoanticorpos na autoimunidade ainda são incertos (ZACHOU et al., 2004), mostrando que eles não são totalmente específicos para a HAI-1. Uma possível explicação é o fato de que na hepatite C

crônica, toda a estrutura arquitetônica do fígado é modificada, principalmente nos casos de fibrose, onde a exposição de epítomos de antígenos hepáticos se torna maior, podendo favorecer o aparecimento desses autoanticorpos. Além disso, a estrutura genética da nossa população pode estar influenciando nesta diversificada expressão de autoanticorpos na hepatite C, como manifestação de autoimunidade.

Quanto ao anticorpo anti-LKM-1, este não foi detectado em nenhum dos grupos avaliados, visto que este autoanticorpo tem participação significativa em casos de HAI-2 e não HAI-1 e também pode estar presente na HCC (CLIFFORD et al., 1995). Esse dado corrobora com os achados do grupo para a pesquisa deste autoanticorpo na população baiana (ATTA et al., 2009).

Já vem sendo demonstrada a influência da origem geográfica para o desenvolvimento do anti-LKM-1, mostrando que apenas de 0-7% dos pacientes com HCC apresentam positividade para esse autoanticorpo (ZACHOU et al., 2004), o que sugere que mais uma vez, a estrutura genética de cada população determina a prevalência para este autoanticorpo. No entanto, novos estudos têm demonstrado que, na hepatite C, o anti-LKM-1 pode apresentar diferente reatividade para epítomos de outros membros da superfamília da citocromo P450 (CYP), sejam estes tanto epítomos lineares quanto conformacionais.

Provavelmente, o fato de os testes atuais de rotina não permitirem a detecção de anticorpos específicos, para esses diferentes antígenos, ocasionem a subnotificação da ocorrência de anti-LKM-1 nos portadores de hepatite viral C (VIDALI et al., 2007).

Já o anti-LC1 foi encontrado de forma bastante relevante, nos pacientes com AML positivo (52%), assim como no grupo com AML negativo (15%), diferentemente do grupo de controles sadios, onde este autoanticorpo não foi detectado.

O anti-LC1 é um marcador sorológico de hepatite autoimune do tipo 2 considerado mais específico do que o anti-LKM-1, visto que esse último tem sido encontrado em pacientes com HVC, principalmente na Europa (STRASSBURG et al., 2003), o que diminui a sua especificidade.

A maior parte dos trabalhos não tem detectado o anti-LC1 em pacientes com HCC. Geralmente, ele vem associado com anti-LKM-1 não sendo, no entanto,

encontrado quando há a presença de AML e ANA, como mostra o trabalho de Muratori et al (1995), utilizando como métodos de detecção, a imunodifusão e a contraímunoeletroforese. Esse trabalho mostra também que utilizando o método de imunoblot, a detecção de anti-LC1 é inferior, em relação às técnicas acima empregadas, visto que ocorre uma substancial modificação da estrutura tridimensional desse antígeno citosólico, quando submetido ao tratamento com SDS nesta técnica linearizando o antígeno.

No nosso estudo, ocorreu o inverso: houve uma considerável prevalência deste autoanticorpo, provavelmente porque o antígeno altamente purificado não é previamente submetido à eletroforese contendo SDS, e sim, fixado diretamente em linha na membrana. Desta forma, é possível que os anticorpos anti-LC1 possam reconhecer tanto epítopos lineares como conformacionais. Diferente do estudo de Muratori et al. em 1995, foi o trabalho de Invernizzi et al. (2007) que relatou o imunoblot como o melhor método para detectar este autoanticorpo.

Apesar da ocorrência de anticorpos anti-LC1 ser bastante específica, em portadores de hepatite autoimune do tipo 2, um trabalho de Lenzi et al. (1995) demonstrou em uma proporção substancial de adultos, a presença do anti-LC1 como marcadores de infecção pelo VHC. Outro estudo realizado por Pelli et al. (1998) também evidenciou a presença de anti-LC1, em pacientes com hepatite viral C, porém, este autoanticorpo se direcionando para um outro antígeno alvo, diferente do que já é conhecido em casos de HAI-2, utilizando o método de imunodifusão em gel de ágar. Assim como Lenzi et al. em 1995, outro trabalho realizado pelo grupo de Muratori et al., 2010, também explicitou a presença do anti-LC1 em uma larga proporção de pacientes com hepatite viral C.

Diante destes achados, estudos serão especificamente conduzidos para avaliar se os autoanticorpos anti-LC1, presentes nos portadores de HCC, podem indicar uma associação com o efeito citopático viral nas células hepáticas e se podem ser usados como indicador de atividade da doença.

Já o anticorpo AMA-M2 não foi encontrado no nosso grupo, tanto AML positivo quanto negativo. Alguns trabalhos, no entanto, mostram a presença deste autoanticorpo, em baixas proporções, neste grupo de pacientes (RAMOS-CASALS et al., 2005).

Logo, pode-se inferir que os anticorpos relatados acima foram encontrados em nossa população numa prevalência bastante considerável, a qual não era esperada, visto serem estes mais prevalentes em casos de hepatite autoimune do que na hepatite viral C crônica, como no caso do anti-LC1 e anti-SLA/LP, ocasionalmente aqui relatado.

Esse fato sugere que a nossa população tem um perfil de manifestação autoimune distinto de outros grupos populacionais além do fato de que possivelmente, o próprio vírus induza um padrão de reação autoimune diferente do que é visto em outras doenças autoimunes.

Devido a isso, novos estudos, mais aprofundados, devem ser realizados para que estes achados possam ser corroborados e divulgados, e que possam fazer parte do quadro de possíveis marcadores para a hepatite viral C crônica.

## 7. CONCLUSÕES

Uma prevalência de 21% de anticorpos antimúsculo liso foi encontrada nos portadores HCC, sendo a relação homem/mulher de 1,1/1.

A presença dos AML não foi associada a qualquer dos dados demográficos, nem com os dados clínicos e laboratoriais dos portadores de HCC avaliados.

Os anticorpos antimúsculo liso não estão associados à lesão tecidual, podendo ser decorrentes da ativação policlonal induzida pelo VHC.

Os padrões de fluorescência e o título das amostras são informações relevantes na detecção dos anticorpos antimúsculo liso.

A actina-F foi o principal antígeno reconhecido entre os três avaliados que são associados aos AML, embora a grande maioria dos portadores de HCC com e sem AML positivos não apresentaram anticorpos para nenhum deles.

Anticorpos anti-LC1 podem indicar uma associação com o efeito citopático viral nas células hepáticas, podendo ser usado como um indicador de atividade da doença.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. J. O. et al. Smooth muscle antibodies and cryoglobulinaemia are associated with liver fibrosis progression in Brazilian hepatitis c virus carriers. **Braz J Infect Dis.**, v. 15, p. 66-68, 2011.

ANDREAS, F.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for imunoassays. **J Immunol Methods**, v. 221, p. 35-41, 1998.

AKASHI, Y. et al. Autoantibody in a patient with chronic hepatitis c virus infection showing complete remission after interferon therapy. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, p. 925-928, 2002.

ATTA, A. M.; PARANÁ, R.; SOUSA-ATTA, M. L. B. Autoimmunity in Hepatitis C Virus (HCV) Carriers. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, p. 13-14, 2009. Suplemento 2.

BADIANI, R. G. et al. Is autoimmune hepatitis a frequent finding among HCV patients with intense interface hepatitis? **World J. Gastroenterol.**, V. 16, n. 29, p. 3704-3708, 2010.

BELL, T. M. et al. Viral hepatitis and autoimmune disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, p. 419-422, 1999.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. The METAVIR cooperative study group, an algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, p. 189-1993, 1996.

BOGDANOS, D. P. et al. Non organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus infection: do they matter? **Clin Infect Dis**, v. 40, p. 508-510, 2005.

\_\_\_\_\_. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 21, p. 3374-3387, 2008.

BOTTAZZO, G. F. et al. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. **J Clin Pathol**, v. 29, p. 403-410, 1976.

BRADWELL, A. R. et al. Atlas of autoantibody patterns on tissues. **The Binding Site**, p. 32-54, 1997.

BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A.; EMER L. F. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão de literatura. **Pan Am J Public Health**, v. 9, n. 3, p. 161-168, 2001.

CASSANI, F. et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 561-566, 1997.

CAULA, C. et al. Autoanticuerpostisulares y factor reumatóide em la infeccion crônica por vírus de la hepatitis C. **Acta Bioquim. Clin. Latinoam.**, v. 42, n. 1, p. 11-16, 2008.

CHRÉTIEN, P. et al. Non-organ-especific autoantibodies in chronic hepatitis C patients: association with histological activity and fibrosis. **J Autoimmun**, v. 32, p. 201-205, 2009.

CLIFFORD, B. D. et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 21, n. 3, p. 613-619, 1995.

CONCA, P, TARANTINO, G. Hepatitis C virus lymphotropism and peculiar immunological phenotype: effects on natural history and antiviral therapy. **World J. Gastroenterol.**, v.15, n. 19, p. 2305-2308, 2009.

CRAZI, A.; LAFFI, G.; ZIGNEGO, A. L. Hepatitis V virus (HCV) infection: a systemic disease. **Mol Aspects Med**, v.29, p.85-95, 2008.

CZAJA, A. J. Autoimmune liver disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 298-305, 2008.

DUSTIN, L.; RICE, C. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 71-99, 2007.

FARQUHAR, M. J.; MCKEATING, J. A. Primary hepatocytes as targets for Hepatitis C virus replication. **J Viral Hepat**, v.15, p. 849-854, 2008

FARROW, L. J.; HOLBOROW, E. J.; BRIGHTON, W. D. Reaction of Human smooth muscle antibody with liver cells. **Nat New Biol**, v. 232, p. 186-187, 1971.

FERRI, C.; ZIGNEGO, A.L.; PILERI, S. A. Cryoglobulins. **J Clin Pathol**, v. 55, n.1, p. 4-13, 2002.

FERRI, C. et al. B-cells and mixed cryoglobulinemia. **Autoimmun. Rev.**, v. 7, p. 114–120, 2007.

FOCACCIA, R. et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 348-355, 2004.

FREY A, DI CANZIO J, ZURAKOWSKI D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J Immunol Methods**, v. 221, p. 35-41, 1998.

GABBIANI, G. et al. Human smooth muscle autoantibody. **Am J Clin Pathol**, v. 72, p. 473-488, 1973.

GALOSSI, A. et al. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. **J Gastrointest Liver Dis.** v. 16, n. 1, p. 65-73, 2007.

GATSELIS, N. K. et al. Impact of parietal cell autoantibodies and non-organ-specific autoantibodies on the treatment outcome of patients with hepatitis C virus infection: a pilot study. **World J. Gastroenterol**, v. 11, n. 4, p. 482-487, 2005.

\_\_\_\_\_. Clinical significance of organ-and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 1563-1573, 2006.

GEHRING, S. et al. Prevalence of autoantibodies and the risk of autoimmune thyroid disease in children with chronic hepatitis C virus infection treated with interferon- $\alpha$ . **World J. Gastroenterol**, v. 12, n. 36, p. 5787-5792, 2006.

GRANITO, A. et al. Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. **J Clin Pathol**, v. 59, p. 280-284, 2006.

GREGORIO, G. V. et al. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. **Clin Exp Immunol**, v. 133, p. 404-413, 2003.

GUIDO, M.; MANGIA, A.; FAA, G. Chronic viral hepatitis: The histology report. **Dig. Liver Dis.**, v. 43S, p. S331-S343, 2011.

GUILLAUME, J. J. M. et al. Smoothelin expression characteristics: development of a smooth muscle cell in vitro system and Identification of a vascular variant. **Cell Struct Funct**, v. 22, p. 65-72, 1997.

HIMOTO, T.; NISHIOKA, M. Autoantibodies in in hepatitis C virus – related chronic liver disease. **Hep Mon**, v. 8, n. 4, p. 295-303, 2008.

HOOFNAGLE, J. H. Hepatitis c: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, v. 26, p. 15S-20S, 1997.

INVERNIZZI, P.; LEO, A.; PODDA, M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases. **Semin Liver Dis**, v. 27, n. 2, p. 161-172, 2007.

KATONA, S. J. et al. Whiter smooth muscle antibodies in the third millennium? **J Clin Pathol**, v. 55, p. 558-560, 2002.

LANDAU, D. A. et al. The pathophysiology of HCV induced B-cell clonal disorders. **Autoimmun. Rev.**, v. 6, p. 581-587, 2007.

LAUER, G. M.; WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 41-52, 2001.

LENZI, M. et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. **Gut**, v.36, p. 749-754, 1995.

LEPE, R. et al. Ethnic differences in the presentation of chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 13, p. 116-120, 2006.

LEVY, S.; TODD, S. C.; MAECKER, H. T. CD81 (tapa-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 89-109, 1998.

MAKARITSIS, K. P. et al. Polyclonal hypergammaglobulinemia and high smooth-muscle autoantibody titers with specificity against filamentous actin: consider visceral leishmaniasis, not just autoimmune hepatitis. **J. Infect. Dis.**, v. 13, p. e157-e160, 2009.

MANN, A. G. et al. Hepatitis C in ethnic minority populations in England. **J Viral Hepat**, v. 15, p. 421-426, 2008.

MARTINEZ-NEIRA, R.; REMEDIOS, C. G.; MACKAY, I. R. An actin-myosin functional assay for analysis of smooth muscle (anti-microfilamente) autoantibodies in human plasma. **J Immunol Methods**, v. 338, p. 63-66, 2008.

MCMURRAY, R. W.; ELBOURNE, K. Hepatitis C virus and autoimmunity. **Semin Arthritis Rheum**, v. 26, n. 4, p. 689-701, 1997.

MIYAKAWA, H. et al. Low frequency of anti-SLA/LP autoantibody in adult patients with autoimmune liver diseases: analysis with recombinant antigen assay. **J Autoimmun.**, v. 21, p. 77-82, 2003.

MURATORI, L. et al. Detection of anti-liver cytosol antibody type 1 (anti-LC1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of different techniques. **J Immunol Methods**, v. 187, p. 259-264, 1995.

\_\_\_\_\_. Current topic in autoimmune hepatitis. **Dig. Liver Dis.**, v. 42, n. 11, p. 757-764, nov. 2010.

MURATORI, P. et al. Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in the general population. **Clin Exp Immunol**, v. 131, p. 118-121, 2003.

OKAZAKI, T.; NAGAI, T.; KANNO, T. Gel-diffusion procedure for the detection of cryoglobulins in serum. **Clin Chem**, v. 44, p. 1558-1559, 1998.

OMLAND, L. H. et al. Mortality in patients with chronic and cleared hepatitis C viral infection: a nationwide cohort study. **J Hepatol**, v. 53, p. 36-42, 2010.

PAN, J. J.; CRIPPIN, J. S. Hepatitis C and autoimmune hepatitis: what gets treated first? **Curr Hepatitis Rep**, v. 9, p. 15-19, 2010.

PELLI, N. et al. Argininosuccinatelyase: a new autoantigen in liver disease. **Clin Exp Immunol**, v. 114, p. 455-461, 1998.

RAMOS-CASALS, M. et al. Therapeutic management of extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Rheumatology**, v. 42, p. 818-828, 2003.

\_\_\_\_\_. Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. **J Intern Med**, v. 257, p. 549-557, 2005.

\_\_\_\_\_. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: description of 18 cases and review of the literature. **J Viral Hepat**, v. 12, p. 648-654, 2005.

SILVESTRINI, R. A.; BENSON, E. M. Whither smooth muscle antibodies in the third millennium? **J Clin Pathol**, v. 54, p. 677-678, 2001.

SOARES, A et al. Smooth muscle autoantibodies with F-actin specificity. **Autoimmun Rev.**, v. 8, p. 713-716, 2009.

SOUSA-ATTA, M. L. B. et al. Autoimmune aspects of hepatitis C in Bahia (Brazil). **JCR-J. Clin. Rheumatol.**, v. 12, p. S6, 2006.

STAUB, H. L. Vírus da hepatite C, manifestações sistêmicas e o reumatologista. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 38, n. 3, p. 139-146, 1998.

STRASSBURG, C. P. et al. Autoimmunity and hepatitis C. **Autoimmun. Rev.**, v. 2, p. 322-331, 2003.

STROFFOLINI, T. et al. Does an autoimmune profile affect the clinical profile of chronic hepatitis C? An Italian multicenter survey. **J Viral Hepat**, v. 11, p. 257-262, 2004.

TAKAKI, A. et al. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells. **J Viral Hepat**, v. 17, p. 555-562, 2010.

THOMSON, B. J.; FINCH, R. G. Hepatitis C virus infection. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, p. 86-94, 2005.

TOH, B. H. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. **Clin Exp Immunol**, v. 38, p. 621-628, 1979.

TOH, B. H.; TAYLOR, R.; POLLOCK, W. F-actin reactive smooth muscle antibody in subjects with normal liver function. **Pathology**, v. 41, n. 6, p. 572-575, 2009.

VIDALI, M. et al. Detection of auto-antibodies against cytochrome P450E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C. **J Pathol**, v. 46, p. 605-612, 2007.

VISWANATHA, D. S.; DOGAN, A. Hepatitis C virus and lymphoma. **J Clin Pathol**, v. 60, p. 1378-1383, 2007.

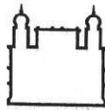
WILLIAMS, M. J. et al. Autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection and their association with disease profile. **J Viral Hepat**, v. 16, p. 325-331, 2009.

ZACHOU, K.; RIGOPOULOU, E.; DALEKOS, G. N. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. **J Autoimmune Dis.**, v. 1-2, p. 1-17, 2004.

ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L. M.; TALAL, A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat.**, v. 14, p. 675-687, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

#### PARECER Nº 58/2004

Protocolo: 162

**Projeto de Pesquisa: Investigação de auto-anticorpos em doadores excluídos em bancos de sangue por hepatite viral C crônica**

**Pesquisador Responsável: Dr. Ájax Mercês Atta**

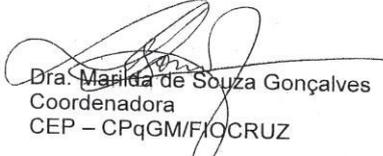
**Instituição ou Departamento: Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Bahia**

#### Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 16 de dezembro de 2004

  
Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Coordenadora  
CEP – CPqGM/FIOCRUZ

## ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Através deste documento, declaro a minha participação voluntária no estudo **Investigação da ocorrência de auto-anticorpos em pacientes portadores de hepatite viral C crônica**, coordenado pelo Drº Ajax Mercês Atta, Professor Titular de Imunologia Clínica e Chefe do Laboratório de pesquisa em Imunologia (LAPIM) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, com endereço á rua Barão de Jeremoabo, s/nº, bairro de Ondina (tel.: 71 – 3283-6972), que tem como objetivo investigar evidências laboratoriais de que estou ou não apresentando auto-imunidade (reação imunológica produzida no meu organismo contra diversos componentes do meu próprio corpo) causada pela infecção crônica pelo vírus da hepatite C, da qual sou portador (a). Com essa finalidade, consinto que seja retirada uma pequena quantidade do meu sangue, equivalente a 25 mililitros, através de colheita realizada em uma das veias do meu antebraço, para que seja usada nesta investigação. Sei, e também fui informado (a) que esta colheita do meu sangue não oferece nenhum risco para minha saúde, assim como não poderá causar nenhuma reação adversa futura ao meu organismo. Nesta mesma oportunidade, fui esclarecido (a), que serão realizados exames de laboratório no meu sangue cujos resultados serão apenas conhecidos pela equipe que os realizou e também pela equipe médica que me acompanha, coordenada pelo Professor Drº Raymundo Paraná, Chefe do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Profº Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, aos quais terei acesso se for minha vontade, e serão mantidos em total sigilo, preservando a minha identidade e privacidade. Além disso, fui também informado (a) que a minha recusa em não participar do estudo, não causara nenhum prejuízo para minha assistência médica e terapêutica, como também não receberei nenhum auxílio financeiro por esta minha atitude de participar da pesquisa. O único benefício que terei será a avaliação laboratorial, sem nenhum custo, se sou portador de auto-imunidade causada pela infecção pelo vírus da hepatite C, a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que me acompanha. Finalmente declaro que sou sabedor que os resultados obtidos neste estudo (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, o que permitira maiores avanços no conhecimento das manifestações clínicas da hepatite C crônica no Brasil, ajudando outros pacientes como eu.

Salvador, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_